
Charakterisierung einer Esterase aus
Paenibacillus pabuli M1
mit
biochemischen und
molekularbiologischen Methoden

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von
Katja Detering
aus Vlotho

1. Referent:	Professor Dr. E. Stackebrandt
2. Referent:	apl. Professor Dr. S. Lang
eingereicht am:	22. Dezember 2003
Disputation am:	30. April 2004
Druckjahr:	2004

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor Prof. Dr. E. Stackebrandt, in dem folgenden Beitrag vorab veröffentlicht:

Patentschrift

Biologisches Rohrreinigungsmittel
PCT/EP 01/06121

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. E. Stackebrandt zum einen für die Überlassung des Themas, aber auch für seine freundliche Unterstützung in schwierigen Zeiten und dafür, daß er mir die Möglichkeit gegeben hat, an dem Thema selbständig zu arbeiten.

Weiterhin möchte ich Herrn Professor Dr. S. Lang für die Übernahme des Koreferates danken.

Außerdem geht ein großer Dank an Herrn Professor Dr. H. Backhorst für seine vielfältigen Anregungen und Ideen

und an die ALADIN- Gesellschaft für innovative mikrobiologische Systeme GmbH, die einen Teil der vorliegenden Arbeiten finanziert hat.

Ein großes Dankeschön an alle Mitarbeiter der AG *Pflanzenzellen*, in deren Abteilung ich die Enzym-Kinetiken angefertigt habe.

Danken möchte ich weiterhin Herrn Dr. N. Weiß für seine Hilfe bei der GC-Analyse und natürlich ebenfalls in diesem Zusammenhang Herrn Dr. B.J. Tindall für seine Unterstützung, eine Vielzahl von Anregungen sowie seine stete *Diskussionsbereitschaft*.

Ein ganz großes Dankeschön auch an alle Mitarbeiter der *Ökologischen Molekularbiologie* und der *Molekularen Systematik*, die mich für den abschließenden Teil der vorliegenden Arbeit aufgenommen haben und darüber hinaus mit Rat und Tat, Tips oder einfach nur einer sehr angenehmen Mittagspause unterstützt haben.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Identifizierungsabteilung

und weiterhin möchte ich Herrn Richard Münch aus der Abteilung Mikrobiologie der TU Braunschweig für seine Hilfe bei der Erkennung bakterieller Promotorbereiche danken

sowie ich auch ganz besonders Frau Susanne Kirschner und Herrn Matthias Reuper dankbar dafür bin, daß sie mir beim Korrekturlesen dieser Arbeit geholfen haben.

Meiner Mutter gilt ein weiterer ganz besonderer Dank für ihre Unterstützung und Hilfe in schwierigen Zeiten,

des weiteren möchte ich H.B. danken, der mich auf seine ganz besondere Art in dieser Zeit begleitet hat.

Außerdem gilt mein Dank allen anderen Freunden und Bekannten für Anregungen und Unterstützungen sowie den hier nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der DSMZ.

meinem Vater Heinz Detering (1937-2000)

Inhaltsverzeichnis

1.	Grundlagen und Zielsetzung	1
1.1	Grundlagen	1
1.1.1	Einleitung	1
1.1.2	<i>Paenibacillus pabuli</i>	2
1.1.3	Biotechnologische Anwendung lipolytischer Enzyme	4
1.1.4	Natürliche Lipase- und Esterase-Substrate	5
1.1.5	Kultivierungsbedingungen	6
1.1.6	Screening auf lipolytische Aktivität	6
1.1.7	Lipasen und Esterasen	6
1.1.7.1	Darstellung einer lipolytischen Reaktion	7
1.1.7.2	Biochemische Eigenschaften von Lipasen und Esterasen	7
1.1.7.3	Kettenlängenspezifität von Esterasen und Lipasen	8
1.1.7.4	Vergleichende Sequenzanalyse bakterieller Lipase- und verwandter Gene	9
1.1.7.5	Definition von Lipasen und Esterasen	11
1.1.8	Stammpoptimierung durch Mutagenisierung	12
1.1.9	Duplikationen in bakteriellen Genomen	13
1.1.10	Makrorestriktionsanalyse	14
1.2	Zielsetzung	16
2.	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien, Lösungsmittel und Enzymsubstrate	17
2.1.2	Bezugsquellen	18
2.1.2.1	Chemikalien	18
2.1.2.2	Lebensmittelfette	19
2.1.3	Geräte	19
2.1.4	Verwendete Software, Datenbanken und Internetadressen	19
2.1.5	Restriktions-Endonukleasen	20
2.1.6	Primer	20
2.1.7	Kits	21
2.1.8	Klonierung	21
2.1.9	Mikroorganismen	21
2.1.10	Lipasen	21
2.1.11	Medien	22
2.1.11.1	Definierte Medien	22
2.1.11.2	Komplexe Medien	22
2.1.11.3	Nachweis lipolytischer Aktivität	23
2.1.11.4	Medien zur Ermittlung von lipolytischer Aktivität im Kulturüberstand	26
2.1.11.5	Caseinabbau-Medium: Nachweis proteolytischer Aktivität	27
2.1.11.6	Medien für die Klonierung	27
2.1.11.7	Medien zur Untersuchung des aeroben Fettsäure-Abbaus	28

2.1.12 Puffer.....	29
2.1.13 Reagenzien für die PFGE.....	30

2.2 Methoden32

2.2.1 Aufbewahrung von Bakterienstämmen.....	32
2.2.1.1 Stammhaltung.....	32
2.2.1.2 Stammkonservierung.....	32
2.2.2 Screening auf lipolytische Aktivität.....	32
2.2.3 Säulenchromatographische Reinigung von Triglyceriden.....	33
2.2.4 Dünnschicht-chromatographische Untersuchungen an natürlichen Fetten.....	33
2.2.5 Protein-Fällung.....	34
2.2.5.1 Fällung mittels kristallinem Ammoniumsulfat.....	34
2.2.5.2 Fällung mittels gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung.....	34
2.2.6 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes.....	35
2.2.7 Lipase-Assay.....	35
2.2.7.1 Emulgationsverfahren.....	35
2.2.7.1.1 Thesit-Dioxan.....	35
2.2.7.1.2 Tween 60.....	35
2.2.7.1.3 β -Naphthylstearat in Gegenwart von Wasser.....	36
2.2.7.1.4 α -Naphthylstearat in Gegenwart von Lecithin-Glycerin.....	36
2.2.7.1.5 Lecithin-Glycerin-Emulsion.....	36
2.2.7.1.6 Gum arabicum-Deoxycholsäure-Emulsion.....	36
2.2.7.2 Nachweis von 1-Naphthol.....	37
2.2.7.3 Enzym-Kinetiken.....	37
2.2.7.3.1 Extrazelluläre lipolytische Aktivität.....	37
2.2.7.3.2 Zelluläre lipolytische Aktivität.....	38
2.2.8 Gaschromatographische Analyse des aeroben Fettsäure-Abbaus.....	38
2.2.8.1 Kultivierung.....	38
2.2.8.1.1 Zugabe der Fettsäurekomponente in die Medien.....	38
2.2.8.1.2 Beimpfen der Kulturen.....	39
2.2.8.1.3 Inkubation der Kulturen.....	39
2.2.8.2 Gaschromatographische Analyse mittel- und langkettiger Fettsäuren.....	39
2.2.8.2.1 Zugabe eines internen Standards.....	39
2.2.8.2.2 Zugabe von Salzsäure.....	39
2.2.8.2.3 Extraktion der Fettsäuren.....	39
2.2.8.2.4 Methylierung.....	40
2.2.8.2.5 Gaschromatographische Analyse.....	40
2.2.8.3 Gaschromatographische Analyse kurzkettiger Fettsäuren.....	41
2.2.8.3.1 Gaschromatographische Analyse.....	41
2.2.9 Mutagenisierungen an <i>Paenibacillus pabuli</i> M1.....	42
2.2.9.1 Mutagenisierung mit UV-Strahlung.....	42
2.2.9.2 Mutagenisierung mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG).....	42
2.2.9.3 Kombination von UV- mit NTG-Mutagenisierung.....	42
2.2.9.4 Zugabe von Kupfer(II)Chlorid-Ionen während der UV-Mutagenisierung.....	43
2.2.10 Makrorestriktions-Analyse.....	43
2.2.10.1 Kultivierung der Organismen.....	43
2.2.10.2 DNA-Präparation: Anfertigen der Agarose-Plugs.....	44
2.2.10.3 Verdau mit Lysozym.....	44
2.2.10.4 Verdau mit Proteinase K.....	44
2.2.10.5 Verdau mit selten-schneidenden Restriktions-Endonukleasen.....	45
2.2.10.6 Auftrennung der DNA-Fragmente.....	45

2.2.11 Anfertigung einer Genbibliothek	46
2.2.11.1 Kultivierung der Organismen und DNA-Präparation	46
2.2.11.2 Partialverdau genomischer DNA mit <i>EcoRI</i> und <i>Sau3A</i>	46
2.2.11.3 Verdau des pBluescript® II SK (+) Phagemid-Vektors	47
2.2.11.4 Dephosphorylierung der Plasmid-DNA	47
2.2.11.5 Ligation	48
2.2.11.6 Transformation	48
2.2.12 Screening auf Expression von lipolytischer Aktivität	49
2.2.13 Sequenzierung	49
2.2.13.1 Minipräparation von Plasmid-DNA	49
2.2.13.2 Amplifikation der klonierten Inserts	50
2.2.13.3 Plasmid-Präparation	50
2.2.13.4 M13-PCR	50
2.2.13.5 Primer Walking	51
2.2.13.6 Sequenzierung	51
2.2.13.7 Cycle Sequencing-PCR	51
2.2.13.8 Herstellung eines Polyacrylamid-Gels	52
2.2.14 Amplifikation des Esterase-Gens	52

3. Ergebnisse	54
----------------------	-----------

3.1 Gaschromatographische Untersuchungen des aeroben Fettsäure- Abbaus bei <i>Paenibacillus pabuli</i> M1	54
3.1.1 Abbau freier Stearinsäure	54
3.1.2 Abbau freier Ölsäure	55
3.1.3 Abbau freier Linolsäure	55
3.1.4 Fettsäureabbau in Gegenwart von Glucose	55
3.1.4.1 Untersuchung des Abbaus kurzkettiger Fettsäuren in Gegenwart von Glucose	56
3.1.4.2 Untersuchung des Abbaus mittel- und langkettiger Fettsäuren in Gegenwart von Glucose	57
3.1.5 Untersuchung des aeroben Abbaus unter Verwendung der Fettsäuren als Natrium-Salze	58
3.1.5.1 Untersuchung des Abbaus kurzkettiger Fettsäuren als Natrium-Salze	58
3.1.5.2 Untersuchung des Abbaus mittel- und langkettiger Fettsäuren als Natrium-Salze	59
3.1.6 Zugabe von Gum arabicum und Deoxycholsäure	60
3.2 Dünnschicht-chromatographische Untersuchungen an natürlichen Fetten	61
3.2.1 DC-Auftrennung von Sonnenblumenöl	61
3.2.2 DC-Auftrennung von Kokosfett	62
3.2.3 DC-Untersuchung von Sonnenblumenöl nach einem Säulen- chromatographischen Reinigungsschritt	63
3.2.4 DC-Untersuchung von Kokosfett nach einem Säulen-chromatographischen Reinigungsschritt	64
3.2.5 DC-Nachweis von Mono-, Di- und Tristearinsäure sowie freier Stearinsäure	65
3.2.5.1 DC-Nachweis von Mono- und Diglyceriden	65
3.2.5.2 DC-Nachweis freier Stearinsäure	66
3.2.5.3 DC-Nachweis von reinen Triglyceriden	66
3.2.5.4 R _f -Werte	67

3.3	Mikrobiologischer Nachweis lipolytischer Aktivität	69
3.3.1	Tween-Verbindungen	69
3.3.2	Spirit Blue-Medium	70
3.3.3	Rhodamin B-Medium	70
3.3.4	Tributyrin Agar-Platten	72
3.3.5	Vergleich von <i>Paenibacillus pabuli</i> M1 mit weiteren Organismen	72
3.4	Medienoptimierung	74
3.4.1	Vergleich von <i>Paenibacillus pabuli</i> M1 mit weiteren Gram-positiven und -negativen Organismen	74
3.5	Entwicklung eines Enzym-Assays zur Ermittlung lipolytischer Aktivität	76
3.5.1	Überprüfung der Stabilität des Enzymsubstrates	76
3.5.2	Überprüfung weiterer Emulgationsmethoden: Lecithin-Glycerin und Gum arabicum-Deoxycholsäure	77
3.5.3	Nachweis von Exoproteasen im Kulturüberstand	77
3.5.4	Ammoniumsulfat-Fällung	78
3.5.5	Überprüfung des sterilen Mediums auf lipolytische Aktivität	78
3.5.6	Ermittlung einer Nachweisgrenze für das untersuchte Verfahren	79
3.5.7	Zusammenfassung des Verfahrensablaufes	79
3.5.8	Lipase-Assay	80
3.6	Enzym-Kinetiken	80
3.6.1	Extrazelluläre lipolytische Aktivität	80
3.6.2	Zelluläre lipolytische Aktivität	83
3.6.2	Vergleich von zellulärer und extrazellulärer Enzymaktivität	85
3.6.3	Kettenlängenspezifität weiterer Organismen	86
3.7	Mutagenisierungsarbeiten an <i>Paenibacillus pabuli</i> M1	88
3.7.1	Ermittlung der Strahlendosis für UV _{254 nm}	88
3.7.2	Ermittlung der Lethalitätsrate für UV _{254 nm}	88
3.7.3	Ermittlung der Lethalitätsrate für NTG	88
3.7.4	Screening auf erhöhte lipolytische Aktivität	89
3.7.5	Ermittlung der lipolytischen Aktivität im Wildtyp	89
3.7.6	Vergleich der lipolytischen Aktivität zwischen Wildtyp und mutagenisierten Stämmen	90
3.8	Makrorestriktions-Analyse	93
3.9	Molekularbiologische Untersuchungen an dem Esterase-Gen von <i>P. pabuli</i> M1	96
3.9.1	Darstellung des Verfahrensablaufes	96
3.9.2	Partialverdau des Genoms von <i>Paenibacillus pabuli</i> M1	97
3.9.3	Herstellung einer Genbibliothek von <i>P. pabuli</i> M1	98
3.9.4	Durchmustern der Genbibliothek	98
3.9.5	M13-PCR	99
3.9.6	HindIII-Verdau der M13-PCR-Produkte	100
3.9.7	Esterase-PCR der positiven Klone	101
3.9.8	Translation der Aminosäure- aus der Nukleinsäuresequenz	102
3.9.9	BLAST-Analyse	103
3.9.10	Annotation des sequenzierten Gens	104
3.9.11	Alignment verwandter Aminosäuresequenzen	106
3.9.12	Vergleich der Nukleinsäuresequenzen zwischen dem Wildtyp von <i>P. pabuli</i> M1 und den hergestellten Mutanten	107

4. Diskussion 108

4.1	Aerobe Aufnahme und Verwertung von Fettsäuren durch <i>Paenibacillus pabuli</i> M1	108
4.2	Dünnschicht-chromatographische Untersuchungen an natürlichen Fetten	110
4.3	Mikrobiologischer Nachweis lipolytischer Aktivität	110
4.3.1	Tween-Medium	111
4.3.2	Rhodamin B-Medium	112
4.3.3	Spirit Blue-Platten	113
4.3.4	Tributyrin Agar-Platten	114
4.3.5	Vergleich von <i>Paenibacillus pabuli</i> M1 mit weiteren Organismen	114
4.4	Medienoptimierung	115
4.5	Entwicklung eines Enzym-Assays zur Ermittlung lipolytischer Aktivität	117
4.5.1	Überprüfung von unterschiedlichen Emulgationsmethoden	118
4.5.2	Nachweis von Exoproteasen	119
4.5.3	Ermittlung einer Nachweisgrenze	119
4.5.4	Ammoniumsulfat-Fällung	120
4.6	Enzym-Kinetiken	120
4.6.1	Kettenlängenspezifität	122
4.7	Biochemische Unterscheidung zwischen Esterasen und Lipasen	123
4.8	UV- und NTG-Mutagenisierungen an <i>Paenibacillus pabuli</i> M1	125
4.9	Tandem-Duplikationen	127
4.10	Makrorestriktions-Analyse	128
4.11	Anfertigung einer Genbibliothek	130
4.12	Lokalisation des Esterase-Gens	131
4.13	Annotation des Esterase-Gens	131
4.14	Nachweis von Promotorelementen, Shine-Dalgarno-Boxen und Signalpeptiden	134
4.15	Mutationen	135

5. Zusammenfassung 138

6.	Literaturverzeichnis	140
7.	Anhang	151
7.1	Abkürzungsverzeichnis	151
7.2	<i>Bacillus licheniformis</i> : Kinetiken	152
7.3	<i>Staphylococcus aureus</i> : Kinetiken	154
7.4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> : Kinetiken	156
7.5	<i>Candida rugosa</i> : Kinetiken	158
7.6	Alignment der Nukleinsäuresequenzen des Esterase-Gens aus <i>P. pabuli</i> M1 und der Mutanten 34.7, 34.8, 35.3, 34.16 und 35.7	160
7.7	Alignment von Nukleinsäuresequenzen aus dem Esterase-Gen von <i>Paenibacillus pabuli</i> M1 und acht Esterase-positiven Klonen aus der angefertigten Genbibliothek	163

1.1 Grundlagen

1.1.1 Einleitung

Die Fähigkeit von Mikroorganismen Fette abzubauen ist seit langer Zeit bekannt (Huss, 1908); dabei werden die dafür verantwortlichen bakteriellen Lipasen und Esterasen in der Regel extrazellulär sezerniert und haben sich im Vergleich zu Enzymen pflanzlicher oder tierischer Herkunft als erheblich stabiler erwiesen. Nicht allein aus diesem Grund stellen sie einen interessanten Gegenstand biotechnologischer Forschung und Anwendungen dar. Der industrielle Einsatz mikrobieller Enzyme, insbesondere Lipasen, Esterasen, aber auch Proteasen, Amylasen und Cellulasen, ist in den vergangenen 20 Jahren deutlich gestiegen. Dabei werden Lipasen und Esterasen in der Lebensmittelindustrie verwendet und aufgrund ihrer hochselektiven Eigenschaften von pharmazeutischen Unternehmen zur Herstellung von Feinchemikalien benutzt. Ihren größten Einsatz finden sie aber als Additive bei der Herstellung von Waschmitteln.

Sowohl Lipasen als auch Esterasen katalysieren die lipolytische Umsetzung von Triglyceriden, den Hauptbestandteilen von Fetten. Daraus resultiert eine Besonderheit *lipolytisch-aktiver* Enzyme. Sie sind in der Lage, an einer Phasengrenze zwischen lipophilem Substrat und hydrophilem Milieu zu agieren und dabei ein sehr breites Substratspektrum umzusetzen. In Abhängigkeit vom Wassergehalt zeigen sie außerdem die Fähigkeiten, sowohl die Hydrolyse als auch die Synthese von Triglyceriden zu katalysieren. Sie wirken darüber hinaus bezüglich der von ihnen umgesetzten Substrate hochselektiv. Dieses Phänomen erklärt sich durch Stereo- Regio- und Enantioselektivitäten, sowie durch Spezifizierungen für bestimmte Fettsäuren bezüglich der Kettenlänge oder des Vorliegens von Doppelbindungen im Molekül. Zu ihren besonderen Eigenschaften gehört weiterhin, daß sie in organischen Lösungsmitteln stabil und aktiv sind. Im medizinischen Bereich steuern sie z.B. im Lipidstoffwechsel den Abbau von Fetten und werden dabei durch Gallensalze aktiviert. Der Nachweis einer *Pankreatitis*, einer krankhaften Bauchspeicheldrüsenentzündung, wird daher in der Routinediagnostik über eine meßbare Erhöhung der lipolytischen Aktivität im Blut geführt.

Die vorliegenden Untersuchungen sind aus einem gemeinsamen Projekt zwischen der DSMZ, der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, und der Aladin-Gesellschaft für innovative mikrobiologische Systeme GmbH, einem jungen Berliner Biotechnologie-Unternehmen, hervorgegangen. Sie wurden im Rahmen der Markteinführung und Weiterentwicklung eines zweiphasigen mikrobiologischen Produktes durchgeführt, das in der Zwischenzeit von der Henkel KGaA, Düsseldorf, übernommen wurde

und in Deutschland sowie dem europäischen Ausland auf dem Markt etabliert ist. Es besteht im wesentlichen aus zwei unterschiedlichen Komponenten, die bevorzugt in Abwassersystemen eingesetzt werden und dort aufgrund ihrer speziellen Wirkungsweise Fettablagerungen abbauen (Detering, 1995). Die erste Komponente dient als Matrixsubstanz, die zum einen eine Stickstoffquelle liefert und zum anderen die Fixierung der eingesetzten Organismen an den Wandungen der Rohre gewährleistet. Die zweite Komponente besteht aus einem Endosporenbildenden Bakterium der Art *Paenibacillus pabuli*. Es wird im Anschluß an die Zugabe der ersten Komponente in das Abwassersystem eingebracht.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist es gewesen, die *lipolytisch-aktiven* Enzyme im Kulturüberstand dieses Organismus zunächst genauer zu charakterisieren. Dabei wurde besonders die Fettsäurespezifität im Detail betrachtet und mit denen anderer Organismen verglichen. Dieses Verfahren sollte später verwendet werden, um einen Vergleich zwischen dem Wildtyp von *Paenibacillus pabuli* M1 und den mutagenisierten Stämmen anstellen zu können. Außerdem wurde der aerobe Abbau bestimmter Fettsäuren ausführlich charakterisiert. Daraufhin wurde eine Kombination aus UV- und Nitrosoguanidin-Mutagenisierungen (NTG) durchgeführt, um die Ausbeute an lipolytisch-aktiven Enzymen im Kulturüberstand von *Paenibacillus pabuli* M1 signifikant zu steigern. Anschließend Beobachtungen auf molekularbiologischer Ebene sollten Aufschlüsse über die Verwandtschaft und Funktion der vorliegenden Enzyme mit denen anderer Organismen und außerdem Einblicke in die Veränderungen des Genoms durch die entstandenen Mutagenisierungsereignisse liefern.

1.1.2 *Paenibacillus pabuli*

Bei dem Organismus, dessen lipolytisches Potential in den vorliegenden Untersuchungen genauer charakterisiert wurde, handelte es sich um einen Vertreter der Art *Paenibacillus pabuli*. Der Stamm M1 war aus einem bereits auf dem Markt etablierten Produkt isoliert und taxonomisch charakterisiert worden (Detering, 1995). Ursprünglich als *Bacillus pabuli* beschrieben, wird diese Art seit den Untersuchungen von Ash (1991, 1993) als Vertreter der Gattung *Paenibacillus* betrachtet. Diese basierten auf der Auswertung von Analysen der 16S rRNA. Damit wurden zunächst 51 verschiedene *Bacillus*-Spezies in fünf verschiedene Cluster unterteilt. Die daraus resultierende RNA-Gruppe 3 wurde später als neue Gattung *Paenibacillus* von den eigentlichen Bacillen unterschieden. Zu diesen mit *Paenibacillus polymyxa* verwandten Spezies gehört unter anderen auch *Paenibacillus pabuli*.

Die Bildung verschiedener polymerabbauender Exoenzyme ist innerhalb der Gattung verbreitet, variiert allerdings nach Spezies bezüglich des Spektrums der verwertbaren Substrate. Ash *et al.* (1993) geben als ein typisches Habitat von Arten der Gattung *Paenibacillus* kompostierendes Pflanzenmaterial an, in dem die Expression dieser Enzyme einen deutlichen Selektionsvorteil bringen dürfte. Auch Priest (1993) beschreibt das häufige Auftreten der Vertreter dieser Gattung auf Kompost und verrottendem Pflanzenmaterial. Zu den gemeinsamen Merkmalen dieser Spezies gehört außerdem, daß es sich um bewegliche Stäbchen handelt, die Katalase-positiv reagieren. Sie werden zu den Gram-positiven Organismen gruppiert, während ihre Zellwand jedoch häufig Gram-variabel färbt. Gegenüber Sauerstoff verhalten sie sich fakultativ anaerob. Sie bilden ovale Sporen mit geschwollenen Sporangien (Abb. 1 und 2). Die Zellen von *P. pabuli* erreichen eine Breite von 0.5-1 µm und eine Länge von 2-4 µm. Der GC-Gehalt beträgt 49 mol%. Die Spezies wurde häufig aus Bodenproben aber auch von Futtermittel isoliert (Nakamura, 1984). In nährstoffarmen Böden treten die Vertreter dieser Art selten auf, weil sie an komplexere Nährstoffvorkommen angepaßt sind.

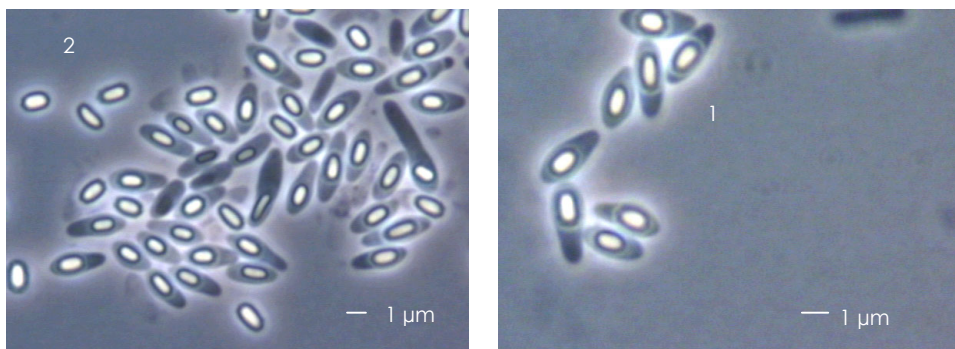


Abb. 1 und 2.

***Paenibacillus pabuli* M1.**

Die stark lichtbrechenden Endosporen des Organismus sind deutlich innerhalb der vegetativen Zellen zu erkennen. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 24 Stunden auf Sporulations-Medium (2.1.11.2) bei 28°C (Phasenkontrast-Aufnahme).

1: Vegetative Zellen mit Endosporen im Inneren, **2:** Freigesetzte Endosporen.

1.1.3 Biotechnologische Anwendung lipolytischer Enzyme

Ein erheblicher Teil der natürlichen Öle und Fette wird von der Industrie zur Herstellung und Veredelung von Lebensmitteln, Kosmetika sowie pharmazeutischen Produkten verwendet. Der Marktanteil von lipolytisch-aktiven Enzymen lag 1989 mit einem Umsatz von ungefähr 20 Millionen Dollar bei etwa 4 Prozent des weltweiten Enzymmarktes. Er konnte in der Zwischenzeit jedoch deutlich gesteigert werden (Kroll, 1994). Die aktuellen Zahlen belegen sogar, daß er eine Milliarde Dollar im Jahr erreicht (Godfrey und West, 1996).

Aufgrund ihrer hochspezifischen Wirkungsweise werden Lipasen von der Pharmaindustrie zur Herstellung von Feinchemikalien verwendet. Aber auch die Waschmittelindustrie setzt zur Hydrolyse von Fetten verstärkt lipolytisch-aktive Enzyme ein. Ihre Anwendung bietet den Vorteil, daß gleiche Waschleistungen bei niedriger Temperatur und besserer Umweltverträglichkeit erreicht werden. Eines der prägnantesten Beispiele dafür ist die *Lipolase*, ein Produkt von Novo Nordisk. Dabei handelt es sich um eine Lipase aus *Humicola lanuginosa*, die in *Aspergillus oryzae* exprimiert wurde und inzwischen Anwendung in 45 Prozent aller Waschmittel findet.

Seit Jahren ist man außerdem bestrebt, durch den Einsatz von Mikroorganismen und Enzymen umweltverträgliche Verfahren für die Behandlung von Abwassersystemen zu entwickeln und kommerziell zu nutzen. Die vorliegenden Untersuchungen sind Teil der Weiterentwicklung eines derartigen mikrobiologischen Produktes zur Behandlung von Abwassersystemen in Krankenhäusern, Großküchen und Hotels. Gelangen Fette und Öle in die Kanalisation, können sie dort aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften zu erheblichen Problemen durch Verstopfung der Rohre führen. Anstelle aggressiver Chemikalien werden heute u.a. lipolytisch-aktive Mikroorganismen und Enzyme eingesetzt, die sich auch durch eine deutlich bessere Umweltverträglichkeit auszeichnen. Sie dienen zum einen der Inokulation im Abwassersystem und können darüber hinaus einen aktivierenden Effekt auf die bestehende Mikroorganismenpopulation ausüben (Sczesny, mündliche Mitteilung). *Paenibacillus pabuli* M1 wurde aus einem bereits auf dem Markt vorhandenen Produkt dieser Art isoliert (Detering, 1995). Mehrere Eigenschaften des Organismus sind in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung. Zum einen handelt es sich um einen Endosporen-bildenden und zum anderen um einen fakultativ anaeroben Organismus, der als Vertreter der Risikogruppe 1 ohne größere Schwierigkeiten in Abwassersystemen eingesetzt werden darf. Die Überlegung, einen Endosporen-bildenden Organismus zu verwenden, spielte u.a. in Bezug auf die Lagerung des Produktes, aber auch in Bezug auf den Einsatz im Abwassersystem, eine wesentliche Rolle.

Seine Toleranz gegenüber Sauerstoff-reduzierten Umweltbedingungen stellte einen weiteren Vorteil gegenüber anderen Organismen dar.

Im Gegensatz zur Anwendung von *Enzymen* aus gentechnisch-veränderten Organismen (GVO), die bereits seit Jahren von der Industrie vermarktet werden, unterliegt die Freisetzung *gentechnisch-veränderter Organismen* in die Umwelt und damit auch in Abwassersystemen einem Genehmigungsvorbehalt (Kommission der Europäischen Gemeinschaften, 1988a und 1988b). Der Ertrag an Lipasen ist in nicht-optimierten Stämmen relativ gering, denn er beträgt nur wenige Milligramm pro Milliliter Medium (Godtfredsen, 1989). In der Anfangsphase hat man zunächst durch den Einsatz klassischer Mutagenisierungs- und Screening-Programme versucht, die Ausbeuten an lipolytischen Enzymen so zu steigern, daß eine industrielle Produktion ökonomisch sinnvoll wurde. Ein echter Durchbruch bei der Verbesserung von Erträgen ließ sich erst durch die Klonierung von Lipase-Genen unter Verwendung effizienter Expressionsvektoren erzielen (Godtfredsen, 1989). Allerdings führt dieser Sachverhalt auch dazu, daß der Organismus als *gentechnisch-veränderter* einzustufen ist. Damit ist die Anwendung gentechnisch-veränderter Organismen im wesentlichen auf den Bereich der Produktion von Stoffen und Enzymen in biologischen Reaktoren beschränkt (Kommission der Europäischen Gemeinschaften, 1988a und 1988b). Aus diesem Grund entstand die Zielsetzung in den vorliegenden Untersuchungen, eine Steigerung der lipolytischen Aktivität bei *Paenibacillus pabuli* M1 durch klassische Mutagenisierungen unter Verwendung von UV-Strahlung und Nitrosoguanidin hervorzurufen und nicht darauf zurückzugreifen, das für diese Eigenschaft verantwortliche Gen in einen effizienten Expressionsvektoren zu klonieren und anschließend die Kopienzahl zu optimieren.

1.1.4 Natürliche Lipase- und Esterase-Substrate

Öle und Fette werden als Bestandteile und Speicherstoffe in allen lebenden Zellen gebildet. Die jährliche Produktion von weltweit über 70 Millionen Tonnen an natürlichen Fetten (Gunstone, 1989) gelangt anschließend in die industrielle Verwertung. Dabei sind über 75 Prozent dieser Lipide pflanzlichen Ursprungs. Sie stammen überwiegend aus Sojabohnen, Kokospalmen, Sonnenblumen und Raps. Zu den restlichen tierischen Fetten gehören insbesondere auch die marinen Öle. Der Hauptbestandteil dieser Fette setzt sich aus Triglyceriden zusammen. Diese zählen neben den Kohlenhydraten zu den wichtigsten Speicherstoffen in der Natur. Triglyceride bilden die natürlichen Substrate von Lipasen und Esterasen, die als zelluläre und extrazelluläre Enzyme in allen Organismen und Zelltypen auftreten und einen wesentlichen Bestandteil des Lipidstoffwechsels darstellen.

1.1.5 Kultivierungsbedingungen

Die Funktion von u.a. lipolytischen Enzymen, aber auch von Proteasen, besteht darin, zusätzliche Energiequellen in Abwesenheit anderer Kohlenstoffressourcen zu erschließen. Der Ertrag an extrazellulären Lipasen und Esterasen ist aus diesem Grund stark von den verschiedensten Kultivierungsbedingungen abhängig. Dabei verhalten sich Stämme unterschiedlicher Arten so abweichend voneinander, daß keine allgemeingültigen Konditionen abgeleitet werden können (Brune und Götz, 1992). Untersuchungen zur Lipase-Sekretion in das Medium bei psychrophilen Organismen haben gezeigt (McKellar, 1986), daß sie einer Katabolit-Repression durch Glucose unterliegen, während bei anderen psychrophilen Organismen Lipasen konstitutiv gebildet werden. Des weiteren finden sich in der vorliegenden Literatur sehr widersprüchliche Angaben zur Notwendigkeit von Aminosäuren für die Lipase-Produktion (Brune und Götz, 1992). Gemäß den Angaben dieser Autoren sind die Bedingungen für eine optimale Lipase-Bildung für jeden Organismus individuell zu testen.

1.1.6 Screening auf lipolytische Aktivität

Aufgrund der enormen Diversität von Lipasen und Esterasen bezüglich der umgesetzten Substrate sind unterschiedlichste Verfahren beschrieben worden, Aktivitäten bereits auf festen Nährmedien zu detektieren. Oftmals wird Rhodamin B dem Medium zugesetzt. Dieser Farbstoff ist in der Lage, die Abbauprodukte lipolytischer Aktivität nachzuweisen, indem er mit diesen Komponenten Komplex-Verbindungen eingeht, die anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden können (Kouker und Jaeger, 1987). Auch Tween-Verbindungen wurden vielfach zur Detektion von Lipase-Aktivitäten verwendet (Sierra, 1957). Dabei handelt es sich um Polyoxyester des Sorbitans, die mit unterschiedlich langen Fettsäuren substituiert sind (Tab. 4). Eines der am häufigsten eingesetzten Substrate in mikrobiologischen Medien ist Tributyrin. Aber darüber hinaus finden auch natürliche Fette, z.B. Kakaobutter, Olivenöl, Kokosfett, bei der Herstellung von Lipase-detektierenden Medien Verwendung.

1.1.7 Lipasen und Esterasen

Lipasen (EC 3.1.1.3) und Esterasen (3.1.1.1) katalysieren u.a. die hydrolytische Umsetzung von Fettsäuren an Triglyceriden; sie werden unter dem Oberbegriff *lipolytische-aktive Enzyme* zusammengefaßt.

1.1.7.1 Darstellung einer lipolytischen Reaktion

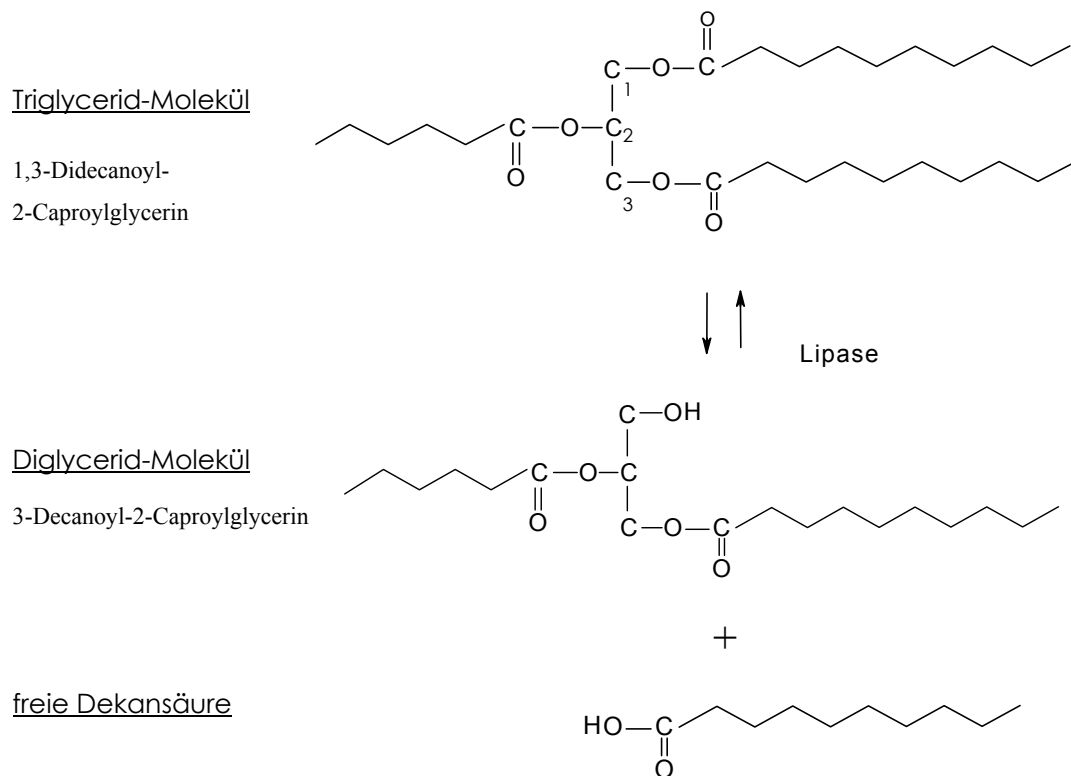
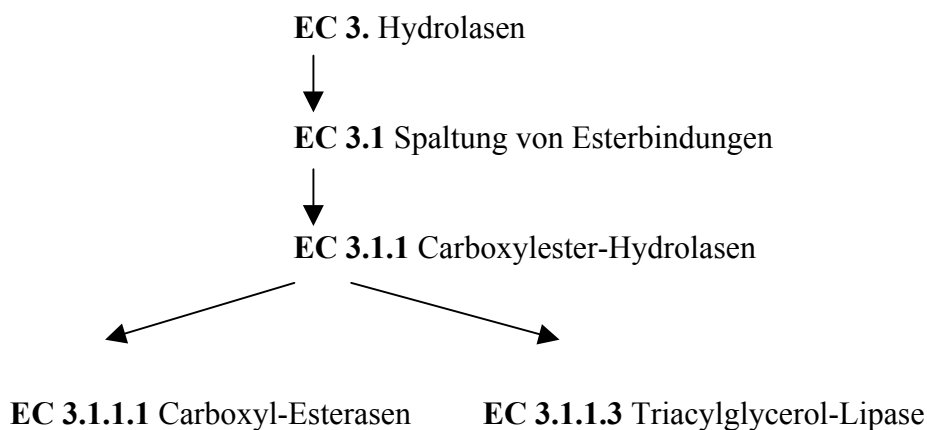


Abb. 3.
Lipolytische Reaktion.

Der katalytische Angriff des Enzyms erfolgt an der Position *sn*-1 des Triglycerid-Moleküls. Einige Lipasen weisen eine Spezifität für die Positionen *sn*-1 und *sn*-3 am Glycerin-Molekül auf, während andere Enzyme die Esterbindungen an allen drei Positionen zu spalten vermögen.

1.1.7.2 Biochemische Eigenschaften von Lipasen und Esterasen

Eine biochemische Klassifizierung von Esterasen und Lipasen aufgrund ihrer Reaktivität wird von dem *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)* vorgenommen und zeigt folgenden Aufbau:



Lipasen sind in der Lage, Transesterifikationen, Esterifikationen und stereoselektive Hydrolyse-Reaktionen zu katalysieren.

Die *Esterifikation* bezeichnet die Umkehrreaktion zur hydrolytischen Spaltung. In einem System mit niedriger Wasseraktivität kann eine Lipase die Esterbindung von freien Fettsäuren und Alkoholen katalysieren.

Die *Trans- oder auch Interesterifikation* wird vorwiegend dazu benutzt, den Schmelzpunkt von Fetten zu verändern, indem im Triglyceridmolekül durch den regiospezifischen Angriff einer Lipase Fettsäuren gegeneinander ausgetauscht werden. Ein patentiertes Verfahren ist die Interesterifikation von Palmöl. Dieser Rohstoff besteht im wesentlichen aus Dipalmitoyl-2-oleoylglycerin. In Gegenwart einer 1,3-spezifischen Lipase und Stearinsäure oder Tristearylglycerin entstehen 1(3)-Palmitoyl-3(1)-stearoyl-2-oleoylglycerin und 1,3-Distearoyl-2-oleoglycerin. Diese Produkte sind Bestandteile der wesentlich teureren Kakaobutter (Macrae, 1983), die bei der Schokoladenfertigung und in der Kosmetikindustrie als Rohstoff Verwendung findet.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal zahlreicher Lipasen (Kroll, 1994) besteht in der regiospezifischen Wirkung gegenüber bestimmten Positionen innerhalb Fettsäureglycerolestern (Abb. 3). Neben Lipasen, die aufgrund ihrer unspezifischen Wirkung die Fettsäuren aus allen Glyceridpositionen gleichermaßen spalten (so z.B. die Lipasen aus *Candida rugosa* und *Staphylococcus aureus*), gibt es Enzyme, die Fettsäuren bevorzugt aus den Positionen *sn*-1 und *sn*-3 der Glyceride abtrennen. Die in Position *sn*-2 angeesterten Säuren werden hingegen überhaupt nicht oder nur in stark geminderter Geschwindigkeit freigesetzt (Godfredsen, 1989). Dieser Sachverhalt trifft z.B. bei der Pankreaslipase zu, aber auch bei einigen mikrobiellen Enzymen konnte diese Eigenschaft nachgewiesen werden (*Mucor mihei*, *Burgholderia cepacia* und *Rhizopus arrhizus*). Des weiteren ist bei Lipasen die Fähigkeit nachgewiesen worden, zwischen den Enantiomeren eines Stoffes unterscheiden zu können (Enantioselektivität).

1.1.7.3 Kettenlängenspezifität von Esterasen und Lipasen

In den vergangenen Jahren wurde gezeigt, daß die Kettenlängen der im Triglycerid-Molekül vorliegenden Fettsäuren ebenfalls einen erheblichen Einfluß auf die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion von Lipasen und Esterasen ausüben. Diese Spezifität für bestimmte Fettsäuren konnte z.B. für die Lipase aus *Achromatobacter lipolyticum* und *Geotrichum candidum* nachgewiesen werden, die vornehmlich ungesättigte Fettsäuren umsetzen. Enzyme aus *Penicillium roqueforti* spalten unabhängig von ihrer Position im Triglycerid-Molekül bevorzugt kurzkettige Fettsäuren (Kroll, 1994). Auch bei *Staphylococcus hyicus* wurde

nachgewiesen, daß die Lipase das Substrat Tributyrin deutlich schneller als Triolein spaltet (Brune und Götz, 1992). Die Kettenlängen der Fettsäuren zeigen also einen beträchtlichen Einfluß auf die Enzymaktivität. Als eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wird diskutiert, daß die Größe der Bindungstaschen am Enzym erheblich variieren kann. Lipasen weisen vier Substrat-Bindungstaschen auf, ein *oxyanion hole* und drei weitere Bereiche für die im Triglycerid vorliegenden Fettsäuren an Position *sn*-1, *sn*-2 und *sn*-3. Die unterschiedliche Größe sowie abweichende hydrophile oder hydrophobe Oberflächen in diesen Bereichen erklären Regio-, Enantio- sowie Kettenlängen-Präferenz der Enzyme.

1.1.7.4 Vergleichende Sequenzanalyse bakterieller Lipase- und verwandter Gene

In den vergangenen Jahrzehnten wurden eine Vielzahl von Mikroorganismen beschrieben, die lipolytische Aktivität aufwiesen. In Folge dessen stieg auch die Anzahl bakterieller Lipasen und Esterasen, die isoliert und biochemisch charakterisiert wurden (Ratledge, 1994). Die Klonierung der entsprechenden Gene in geeignete Vektoren lieferte schließlich die ersten Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen. Eine Entwicklung, die durch die Vielzahl von Genomprojekten in den vergangenen Jahren noch forciert wurde, so daß derzeit eine große Zahl sequenzierter Esterasen und Lipasen in den Datenbanken vorliegen. Darüber hinaus haben Röntgenstruktur-Analysen zu einer Aufklärung der Tertiärstruktur einiger dieser Enzyme geführt. Esterasen und Lipasen zeigen nicht nur aufgrund ihrer lipolytischen Eigenschaften erhebliche Übereinstimmungen. Auch das Auftreten konservierter Motive in den Aminosäure- und Nukleinsäuresequenzen sowie strukturelle Ähnlichkeiten haben zu einer Klassifizierung in acht Familien geführt (Arpigny und Jaeger, 1999). Einige Lipasen und Esterasen weisen einen sehr konservierten Bereich auf. Dieses Pentapeptid (G-X-S-X-G) findet sich im aktiven Zentrum der gesamten Gruppe der Serin-Hydrolasen, zu denen auch aus diesem Grund auch diese Lipasen und Esterasen gerechnet werden (Ollis *et al.*, 1992). Darüber hinaus ließ die weitere Auswertung von Daten erkennen, daß Lipasen und Esterasen mit Enzymen, zu denen sie ansonsten eine geringe funktionelle Verwandtschaft besitzen, wie z.B. Haloalkan-Dehalogenasen (Franken *et al.*, 1991), Acetylcholin-Esterasen (Sussman *et al.*, 1988) sowie Serin-Decarboxypeptidasen (Liao *et al.*, 1992) ein gemeinsames Faltungsmuster aufweisen. Aufgrund der Tatsache, daß es sich bei *allen* Enzymen um Hydrolasen handelte, hat man dieses Faltungsmuster *α/β hydrolase fold* genannt (Ollis *et al.*, 1992).

Arpigny und Jaeger (1999) haben als erste den Versuch unternommen, die in den Datenbanken vorliegenden bakteriellen Lipase- und Esterase-Gene auf der Ebene der

abgeleiteten Aminosäuresequenzen zusammenzufassen und eine Klassifikation dieser Enzyme vorzunehmen.

Sie unterscheiden acht Familien, wobei die *erste* 22 Vertreter *echter Lipasen* aufweist. Sie werden charakterisiert durch das Auftreten des konservierten Pentapeptids G-X-S-X-G im katalytischen Zentrum. Zu dieser Gruppe gehören auch die Lipasen der Gattung *Bacillus*, die durch Enzyme aus *B. subtilis* und *B. pumilus* repräsentiert werden. Diese Enzyme sind mit 20-22 kDa gegenüber anderen Lipasen deutlich kleiner. Sie zeigen außerdem in der Aminosäuresequenz des aktiven Zentrums einen signifikanten Unterschied (A-(G)X-S-X-G). Die Position 1 ist statt des Glycinrestes mit einem Alaninrest besetzt. Eine derartige Aminosäuresequenz findet sich auch im katalytischen Zentrum der Protease *Subtilisin* (Brune und Götz, 1992). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wird vermutet, daß Subtilisine und Serin-Hydrolasen, zu denen diese Lipasen gehören, durch konvergente Evolution eines stabilen funktionierenden aktiven Zentrums entstanden sein könnten (Ollis *et al.*, 1992).

Familie II wird charakterisiert durch das Vorkommen eines katalytischen Zentrums, das von dem konventionellen Pentapeptid G-X-S-X-G abweicht. Als zentrale Aminosäure fungiert innerhalb des hier vorliegenden GD₂SL-Motivs ebenfalls ein Serinrest. Ein weiteres interessantes, charakteristisches Merkmal bei Enzymen aus *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* und *Photobacterium luminescens* besteht in der Tatsache, daß eine zusätzliche C-terminale Domäne auftritt, die eine Länge von ca. einem Drittel des gesamten Moleküls erreichen kann und eine enorme Ähnlichkeit zu einer neuen Enzymfamilie von bakteriellen Autotransporter-Virulenzfaktoren aufweist.

Die Enzym-Familie III wurde von Cruz *et al.* (1994) beschrieben. Die in dieser Gruppe zusammengefaßten Enzyme werden durch das Vorkommen einer Tertiärstruktur charakterisiert, die dem α/β hydrolase fold entspricht. Außerdem weisen sie eine katalytische Triade auf, die aus den Aminosäuren S-D-H zusammengesetzt ist.

Des weiteren wurden 6 bakterielle Lipasen und Esterasen in die Familie IV eingeordnet. Sie stammen von Vertretern taxonomisch relativ weit voneinander entfernter Mikroorganismen und sind durch ihre enorme Ähnlichkeit mit hormonsensitiven Lipasen aus Säugetierzellen gekennzeichnet.

Die Enzyme aus Familie V zeigen erhebliche Übereinstimmungen bei einem Vergleich der Aminosäuresequenzen zu bakteriellen nicht-lipolytischen Enzymen (20-25%), vornehmlich Epoxid-Hydrolasen, Dehalogenasen und Haloperoxydasen. Allen Enzymen gemein ist das Vorkommen des typischen α/β hydrolase fold und einer katalytischen Triade (S-D-H).

Mit einem Molekulargewicht von 23-26 kDa sind die bakteriellen Esterasen, die in der Familie VI zusammengefaßt werden, die kleinsten bekannten Enzyme dieser Art. Die 3D-Struktur einer Carboxylesterase aus *Pseudomonas fluorescens* wurde anhand von Röntgenstruktur-Analysen aufgeklärt und ließ erkennen, daß das Enzym in der aktiven Form eine dimere Organisation aufweist. Eine dieser Untereinheiten zeigt den klassischen Aufbau des α/β *hydrolase fold* und ist durch die Anwesenheit einer katalytischen Triade bestehend aus den Aminosäuren S-D-H gekennzeichnet.

Die in der Familie VII zusammengefaßten Enzyme besitzen Molekulargewichte von 55 kDa und lassen erhebliche Übereinstimmungen mit eukaryontischen Acetylcholin-Esterasen, intestinalen Carboxylesterasen sowie Esterasen aus der Leber erkennen.

Die drei Esterasen, die die Vertreter der Familie VIII bilden, erreichen eine Länge von ca. 380 Aminosäuren. Sie zeigen Ähnlichkeit zu einigen β -Lactamasen der Klasse C (30 % identische und 40 % ähnliche Aminosäuren) und weisen ein katalytisches Zentrum auf, das aus den Aminosäuren S-X-X-K (S-T-T-K) gebildet wird. Damit weichen sie erheblich von den Enzymen der strukturellen α/β *Hydrolase*-Superfamilie ab (Wagner *et. al*, 2001), die im katalytischen Zentrum das konservierte Pentapeptid [G (A)-X-S-X-G] aufweisen. Sie zeigen phylogenetische Verwandtschaft zu den genannten β -Lactamasen, aber auch Penicillin-bindenden Enzymen und DD-Peptidasen.

1.1.7.5 Definition von Lipasen und Esterasen

Was ist eine *echte* Lipase und wodurch unterscheidet sie sich von einer Esterase? Diese elementare Frage führt nach Jaeger *et al.* (1999) zu der eindeutigen Aussage, daß sie im Augenblick noch nicht zu beantworten sei.

Mit dem Begriff *Lipase* verbindet man zunächst speziell das Vermögen zur reversiblen Spaltung von Glycerinestern aliphatischer Fettsäuren an einer Lipid-Wasser-Grenzschicht (Brune und Götz, 1992). Die Glycerin-Fettsäureester repräsentieren die eigentlichen Fette, die man mit den fettähnlichen Verbindungen zur Gruppe der Lipide zusammenfaßt. Als Reaktionsprodukte der hydrolytischen Umsetzung entstehen Diglyceride, Monoglyceride, Glycerin und freie Fettsäuren (Abb. 3). Sowohl Esterasen als auch Lipasen sind in der Lage, diese Reaktionen zu katalysieren. Ursprünglich hat man zur Charakterisierung einer echten Lipase zwei Kriterien herangezogen:

(1) Zum einen findet die Lipase-katalysierte Reaktion in Gegenwart einer Lipid-Wasser-Grenzschicht, also in einem zweiphasigen Reaktionssystem statt (Brune und Götz, 1992). Die

lipolytischen Substrate formen innerhalb dieses Systems ein Gleichgewicht zwischen monomeren, micellaren und emulgierten Bestandteilen. Dieses Phänomen wird als *Grenzschicht-Aktivierung* beschrieben (Jaeger *et al.*, 1999).

(2) Zum anderen geht man davon aus, daß *echte* Lipasen einen Deckel aufweisen. Die *Grenzschicht-Aktivierung* von Lipasen wird durch die Wirkung dieses Deckels (flap oder lid) erklärt. Im inaktivierten Zustand versperrt dieser Deckel den Zugang zum aktiven Zentrum des Enzyms. Dieser *flap* kann aus ein oder zwei α -Helices aufgebaut sein (Vasel *et al.*, 1993). Wobei sich die Außenseite dieses Elementes aus hydrophilen Aminosäureresten zusammensetzt, während die Innenseite eher lipophile Eigenschaften aufweist. Im geschlossenen Zustand, d.h. in Abwesenheit einer Phasengrenze, ist durch die geschlossene Konformation des *flaps* das aktive Zentrum des Enzyms nicht zugänglich (Beer, 1995).

Jaeger *et al.* (1999) geben zu bedenken, daß diese Kriterien für eine Klassifikation von Lipasen und Esterasen nicht geeignet erscheinen, weil in den vergangenen Jahren einige Ausnahmen beschrieben wurden (Verger, 1997). Dabei handelt es sich um Enzyme, die einen Deckel aufweisen aber keine Grenzschicht-Aktivierung zeigen. Ursprünglich ging man von der Unterscheidung aus, daß eine wesentliche Eigenschaft von Lipasen in der raschen Hydrolyse von Fettsäureestern innerhalb von Aggregaten besteht, während sie nur sehr langsam mit Monomeren reagieren. Dieses Phänomen wird heute grundsätzlich durch die Grenzschicht-Aktivierung erklärt. Im Gegensatz dazu nahm man an, daß Esterasen bevorzugt Monomere in wässrigen Systemen hydrolysieren. Dieser Sachverhalt führte nach Kroll (1994) zu der Beobachtung, daß Lipasen im Gegensatz zu Esterasen keiner Michaelis-Menten-Kinetik folgen (Macrae, 1985). Jaeger *et al.* (1999) weisen des weiteren darauf hin, daß eine ebenfalls verbreitete Klassifizierung von Lipasen darin besteht, sie als Carboxylesterasen zu beschreiben, die langkettige Acyl-Glycerole ($C > 10$ Atome) spalten, während Esterasen lediglich kurzkettige Substrate umsetzen ($C < 10$ Atome). Eine Festlegung bezüglich der exakten Kettenlänge der umgesetzten Fettsäuren existiert jedoch nicht. Die Autoren wenden ein, daß Lipasen die Fähigkeit besitzen, auch kurzkettige Esterase-Substrate hydrolytisch zu spalten.

1.1.8 Stammoptimierung durch Mutagenisierung

Klassische Verfahren der Stammoptimierung bestehen in einer künstlichen Erhöhung der genetischen Vielfalt (Drake, 1989). Da in der Regel Spontanmutationen jedoch nur selten auftreten, bedient man sich induzierender Faktoren, um die Mutationsraten deutlich zu

erhöhen. Dazu zählen vor allem Bestrahlungen mit UV-Licht oder ionisierender Strahlung, sowie die Supplementierung mit chemischen Agenzien wie NTG, Acridin-Farbstoffen oder Hydroxylamin. Allerdings lassen sich die Wirkungen solcher Behandlungen auch hier nicht von einer Spezies auf die andere übertragen, so daß es erforderlich ist, die Mutagenisierungs-Bedingungen (Konzentration, Expositionsdauer, physiologischer Zustand der Zellen u.ä.) im Einzelfall zu optimieren (Crow *et al.*, 1983).

Seitdem der Umstand bekannt geworden ist, daß UV-Licht einer Wellenlänge von 260 nm von der DNA absorbiert wird, nutzt man diesen Effekt zur Mutagenisierung von Organismen. Nach der Behandlung mit UV-Licht treten vornehmlich Punktmutationen auf (Präve *et al.*, 1987), d.h. es werden Thymin-Dimerisierungen ausgelöst. Werden die überlebenden Zellen Licht einer Wellenlänge von 320-384 nm ausgesetzt, erfolgt nach Mutagenisierung mit UV-Strahlung die Photoreaktivierung. An diesem Reparaturmechanismus ist eine Photolyase beteiligt. Sie gewinnt Energie durch die Absorption des längerwelligen Lichtes. Diese wird anschließend verwendet, um die gebildeten Thymin-Dimere wieder in Monomere zu spalten.

Im Zusammenhang mit der Behandlung von UV-Licht sind Duplikationen in bakteriellen Genomen beobachtet worden. Man geht davon aus, daß DNA-zerstörende Prozesse ihre Bildung verstärken können. Das Vorkommen chromosomaler Tandem-Duplikationen in *Escherichia coli* konnte durch die Bestrahlung mit UV-Licht erheblich gesteigert werden. Dabei stieg ihre nachgewiesene Frequenz nach Bestrahlung mit UV-Licht signifikant (Hill und Cambriato, 1973). Ein vergleichbarer Effekt wurde auch nach Einsatz weiterer mutagener Agenzien, z.B. NTG, beobachtet. Dieses Mutagenz führte zu einer ähnlichen Steigung der Anzahl von Duplikationen im Genom. Im allgemeinen ruft NTG durch die Alkylierung von Basen vorwiegend Transitionen hervor. Es ist außerdem bekannt, daß NTG als eines der effektivsten Mutagene wirkt. Es übt, verglichen mit seiner mutationsauslösenden Wirkung, nur eine relativ geringe Letalität aus.

1.1.9 Duplikationen in bakteriellen Genomen

Repetitive DNA-Sequenzen, z.B. IS-Elemente (Insertions-Sequenzen), führen zu Veränderungen und Destabilisierungen in bakteriellen Genomen (Petes und Hill, 1988). Diese Sequenzen bieten homologe Bereiche für ungleiche Crossing over-Ereignisse. Nach Rekombination der DNA können Inversionen, Deletionen und Tandem-Duplikationen auftreten.

Ein allgemein anerkanntes Modell zur Erklärung von Tandem-Duplikationen in Chromosomen geht davon aus, daß nach der Replikation der DNA die entstandenen zwei

DNA-Stränge sich nicht exakt komplementär gegeneinander ausrichten, sondern an einander homologen repetitiven Sequenzen. Liegen diese sich wiederholenden Sequenzen innerhalb des Genoms weit auseinander, so fallen die korrespondierenden Duplikationen entsprechend groß aus. Die Häufung von Duplikationen in bakteriellen Genomen wird darauf zurückgeführt, daß sie eine Rolle in evolutionären Prozessen spielen (Riley und Aniolis, 1978). Bestimmungen an Tandem-Duplikationen haben gezeigt, daß sie nicht selten Größenordnungen von 320 kb erreichen können. Das entspricht 7% des *Escherichia coli* Chromosoms. Anderson und Roth (1978), Heath und Weinstock (1991) sowie Hill *et al.* (1977) wiesen im Genom von *Salmonella typhimurium* Duplikationen nach, die bis zu 22 Prozent des gesamten Genoms ausmachten. Horiuchi (1963) gelang als erstem der Nachweis, daß eine Duplikation des *lac*-Operons für eine signifikante Steigerung des Wachstums auf Lactose verantwortlich war. Weitere Untersuchungen an *Escherichia coli* konnten Duplikationen mit einer Häufigkeit von 10^{-4} bis 10^{-3} nachweisen. Dabei führte eine Bestrahlung mit UV-Licht zu einer zehnfachen Steigerung von Duplikationen in den meisten Regionen des Genoms (Heath, 1992). Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß das bakterielle Chromosom steten Veränderungen ausgesetzt ist, während derer Duplikationen erworben und wieder verloren gehen. Physikalische Untersuchungen durch Makrorestriktions-Analyse an *Escherichia coli* unter Anwendung der Pulsed-Field Gel Elektrophorese (PFGE) konnten zeigen, daß sie sogar eine Größe von 140 bis 2100 kb aufweisen (Weinstock, 1994, sowie Heath, 1992).

1.1.10 Makrorestriktionsanalyse

Die Makrorestriktionsanalyse ist in der Lage, DNA-Moleküle bis zu einer Größenordnung von 10 Mb aufzutrennen (Römmeling *et al.*, 1994). Diese Technik besteht aus drei unterschiedlichen Verfahrensschritten. Bei der Einbettung der DNA des untersuchten Organismus in Agarose werden zunächst die relativ großen Moleküle innerhalb dieser Matrix präpariert und bleiben so unbeschädigt. Der zweite Schritt besteht in der Verdauung dieser DNA mit selten-schneidenden Restriktions-Endonukleasen (ER) und als dritte Phase folgt die Auftrennung der DNA-Fragmente mittels PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis). Dieses von Schwartz und Cantor (1984) entwickelte Verfahren zur Isolierung unbeschädigter DNA ist in der Lage große DNA-Moleküle, wie z.B. die Chromosomen von Bakterien und Hefen aufzutrennen. DNA dieser Größe ist sehr empfindlich gegenüber Scherkräften, so daß sie nicht unbeschädigt in flüssiger Phase nach Standardmethoden präpariert werden kann. Nach dieser Methode werden bereits die intakten Zellen in eine Agarose-Matrix eingebettet und an

dieser Stelle entsprechend typischer DNA-Isolierungsverfahren behandelt. Die zugeführten Agenzien, wie z.B. zellwandabbauende Enzyme, Proteasen, Detergenzien und Metallchelatoren diffundieren durch die Agarose-Matrix und bewirken dort die Zellysis. Die hochmolekulare DNA verbleibt in der Agarose-Matrix und wird durch diese stabilisiert. Liegt die DNA so präpariert vor, folgt der Verdau mittels Restriktions-Endonuklease. Zielsetzung ist es dabei, die DNA so selten zu schneiden, daß Fragmente mit Längen entstehen, die innerhalb der Auftrennungsgrenzen (10 kb bis 2 Mb) der PFGE liegen. Dabei sollte eine Aufspaltung des Genoms in 10 bis 30 Fragmente erreicht werden.

Restriktions-Endonukleasen wurden in der Vergangenheit aus vielen Prokaryonten isoliert. Ihre Bedeutung scheint darin zu liegen, daß sie in der Lage sind, zellfremde DNA-Moleküle zu schneiden. Die zelleigene DNA wird nicht abgebaut, weil die Erkennungssequenzen durch Methylierung maskiert sind. Zur Fragmentierung der DNA werden häufig Restriktionsenzyme der Klasse II benutzt. Diese besitzen die Eigenschaft spezifische Basensequenzen in einem DNA-Molekül zu erkennen und beide Stränge der Helix durch die Spaltung einer Phosphodiesterbindung zu trennen. Die DNA-Schnittstelle liegt nicht selten innerhalb der Erkennungsregion der Restriktions-Endonuklease. Zur Erzeugung geeigneter DNA-Fragmente muß eine entsprechende Restriktions-Endonuklease für den untersuchten Stamm empirisch ermittelt werden. Ein Grund dafür besteht darin, daß der GC-Gehalt und die Häufigkeit bestimmter Oligonukleotidsequenzen bei verschiedenen Spezies stark variieren können. Im Vergleich zu konventionellen Gel-Elektrophoreseverfahren werden bei der PFGE zwei verschiedene elektrische Felder angelegt. Die DNA-Fragmente werden dabei zunächst einem elektrischen Feld A ausgesetzt, sie orientieren sich entsprechend ihrer Ladung und wandern in der ausgestreckten Konformation durch das Netzwerk der Agarose-Matrix. Entsprechend einer festgelegten Zeit wird ein zweites elektrisches Feld B angelegt. Dieses elektrische Feld sollte in einem Winkel, der größer als 90° ist, zum ersten elektrischen Feld aufgebaut werden. Bevor die DNA-Moleküle entsprechend dem zweiten elektrischen Feld durch die Agarose-Matrix wandern können, müssen sie sich reorientieren und erneut eine mobile Konformation einnehmen. Fragmente unterschiedlicher Größe reorientieren sich in unterschiedlichen Geschwindigkeiten, dadurch kann eine Separation in Abhängigkeit von der Größe der DNA-Moleküle in der Agarose-Matrix erreicht werden.

1.2 Zielsetzung

Ausgehend von einem bekannten Stamm M1 der Art *Paenibacillus pabuli* hatten die vorliegenden Untersuchungen die Zielsetzung, die lipolytischen Enzyme im Kulturüberstand dieses Organismus durch klassische Mutagenisierungsarbeiten zu steigern. Hierfür war es zu Beginn notwendig, das lipolytische Potential dieses Organismus zu charakterisieren. Aus diesem Grund wurde zunächst durch gaschromatographische Analyse die Aufnahme und Verwertung bestimmter Fettsäuren durch *Paenibacillus pabuli* M1 untersucht. Fortgefahren wurde anschließend mit der Entwicklung eines biochemischen Assays, das eine exakte Ermittlung der lipolytischen Aktivität sowohl im Rohextrakt als auch im Kulturüberstand ohne vorhergehende Aufreinigung der Enzyme ermöglichen sollte. Damit wurde zunächst der Wildtyp von *Paenibacillus pabuli* M1 genauer charakterisiert. Zur Vorbereitung der Mutagenisierungsarbeiten war es weiterhin notwendig, ein Screening-Verfahren zu etablieren, welches gewährleistete, bereits durch Kultivierung auf Platten eine Auswahl zwischen den erhaltenen Mutanten zu treffen und gleichzeitig einen Vergleich zum Wildtyp anstellen zu können. Es wurden dazu verschiedene mikrobiologische Lipase-Nachweisverfahren in Hinblick auf Anwendbarkeit, aber auch Aussagekraft untersucht. Die Herstellung dieser Medien setzte u.a. die Etablierung eines Säulen-chromatographischen Verfahrens voraus, das die Trennung zwischen reinen Triglyceriden und den entsprechenden Hydrolyse-Produkten der Fette ermöglichte. Die Darstellung der Reinheit der vorliegenden Komponenten erfolgte unter Anwendung eines entsprechenden Verfahrens auf Dünnschicht-Platten.

Nach der Detektion von Mutanten sollte durch Makrorestriktions-Analyse das mögliche Vorhandensein von Tandem-Duplikationen in den Genomen dieser Stämme nachgewiesen werden.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist es darüber hinaus gewesen, zunächst die Nukleinsäuresequenz des Gens, das die lipolytische Aktivität in *Paenibacillus pabuli* M1 exprimiert, zu ermitteln und anschließend daraus den Open Reading Frame sowie die Aminosäuresequenz abzuleiten. Zum einen sollten diese Daten weitere Aufschlüsse über die Klassifikation des vorliegenden Enzyms erbringen und zum anderen einen Vergleich zwischen Wildtyp und mutagenisierten Stämmen erlauben. Experimentelle Basis hierfür war die Anfertigung einer Genbibliothek von *Paenibacillus pabuli* M1.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Lösungsmittel und Enzymsubstrate

- 1 Aceton, für technische Zwecke, Merck
- 2 Acrylamid/Bisacrylamid, Bio-Rad
- 3 Agar No.1, Oxoid
- 4 Agarose, Gibco
- 5 Aluminiumoxid, Typ 507 C, neutral, 100-125 mesh, für SC, Fluka
- 6 Ammoniumsulfat, z.A., Fluka
- 7 Ampicillin, Fluka
- 8 Bovine Serum Albumin, Sigma
- 9 Bromphenolblau, Sigma
- 10 tertButylmethylether, reinst, Merck
- 11 Capronsäure, Sigma
- 12 Caprylsäure, Sigma
- 13 Casein-Sojamehlpepton-Bouillon, Merck
- 14 Chloroform, Baker
- 15 Decansäure, Reinheitsgrad 99-100%, Sigma
- 16 Deoxycholsäure, Sigma
- 17 Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma
- 18 1,4-Dioxan, p.A., Merck
- 19 Dodecylsulfat, Natriumsalz (SDS), Merck
- 20 Ethidiumbromid, Sigma
- 21 Ethylacetat, z.A., Fluka
- 22 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Fluka
- 23 Folin Ciocalteu's Phenolreagenz, Sigma
- 24 Glycerintributylin, Merck
- 25 Gum arabicum, Merck
- 26 Isopropanol, Baker
- 27 1,2-o-Di-Lauryl-rac-glycero-3-glutaric acid resorufinester, Boehringer
- 28 Laurylsäure, 99-100%, Sigma
- 29 L- α -Lecithin, Sigma
- 30 Linolsäure, Sigma
- 31 Lowry-Reagenz, Sigma
- 32 Methanol, HPLC Reagenz, Baker
- 33 4-Methylumbelliferylstearat, Sigma
- 34 Myristinsäure, Sigma
- 35 Natrium-Butyrat, Sigma
- 36 Natrium-Capronat, Sigma
- 37 Natrium-Caprylat, Sigma
- 38 Natrium-Decanoat, Sigma
- 39 Natrium-Oleat, Sigma
- 40 Natrium-Palmitat, Sigma
- 41 Natrium-Stearat, Sigma
- 42 1-Naphthol, Sigma
- 43 α -Naphthyl-Butyrat, Sigma
- 44 α -Naphthyl-Capronat, Sigma
- 45 α -Naphthyl-Caprylat, Sigma
- 46 α -Naphthyl-Decanoat, Sigma
- 47 α -Naphthyl-Laurat, Sigma

- 48 α -Naphthyl-Myristat, Sigma
- 49 β -Naphthyl-Oleat, Sigma
- 50 α -Naphthyl-Palmitat, Sigma
- 51 α -Naphthyl-Stearat, Sigma
- 52 Nujol Mineralöl, Applied Biosystems
- 53 Nutrient Broth, Difco
- 54 Ölsäure, Sigma
- 55 Olivenöl, reinst, Fluka
- 56 Palmitinsäure, Sigma
- 57 Petroleumbenzin, z.A. 40-60°C, Merck
- 58 2-Propanol, Merck
- 59 Protease Inhibitor-Cocktail, Sigma
- 60 Proteinbestimmungs-Kit, Sigma
- 61 Protein-Standard, Sigma
- 62 Rhodamin B, C.I. 45170, Sigma
- 63 Sojapepton Caseinpepton-Bouillon, Sifin
- 64 Sojapepton, papainisch, Sifin
- 65 Stearinsäure, Sigma
- 66 N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED), Sigma
- 67 Tween 40, Fluka
- 68 Tween 60, Fluka
- 69 Tween 20, Fluka
- 70 Tween 80, Fluka

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

2.1.2 Bezugsquellen

2.1.2.1 Chemikalien

- 1 ALDRICH, Sigma-Aldrich Firmengruppe, Deisenhofen, Deutschland
- 2 BIO-RAD LABORATORIES GmbH, München, Deutschland
- 3 ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Mannheim, Deutschland
- 4 DIFCO LABORATORIES, Detroit, USA
- 5 EUROGENTEC, Seraing, Belgien, [<http://www.eurogentec.be>]
- 5 FLUKA, siehe Aldrich-Firmengruppe
- 6 GIBCO BRL Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
- 7 J. T. BAKER CHEMICALS, Deventer, Niederlande
- 8 MERCK AG, Darmstadt, Deutschland
- 9 MILLIPORE GmbH, Eschborn, Deutschland
- 10 NOVO NORDISK A/S, Bagsvaerd, Dänemark
- 11 OXOID, Basingstoke, Hampshire, England
- 12 RIEDEL-DE HAËN, siehe Aldrich-Firmengruppe
- 13 ROTH, Karlsruhe, Deutschland
- 14 SERVA Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland
- 15 SCHLEICHER und SCHÜLL, Dassel, Deutschland
- 16 SIGMA, siehe Sigma-Aldrich Firmengruppe
- 17 WHEATON, Millville, New Jersey, USA

2.1.2.2 Lebensmittelfette

Zur Herstellung der angegebenen Medien (2.1.11) wurden folgende im Handel erhältliche Lebensmittelfette eingesetzt:

- | | |
|-------------------|---|
| 1. Kakaobutter | Die Drogerie Spinnrad, Braunschweig |
| 2. Kokosfett | Palmin, Union Deutsche Lebensmittel AG GmbH |
| 3. Sonnenblumenöl | Union Deutsche Lebensmittel AG GmbH |

2.1.3 Geräte

Autoklav	Zirbus HST 32/ 25
Binokular	Carl Zeiss Stemi SR
DNA Sequencer 373	Applied Biosystems GmbH
DNA Thermocycler 480	Perkin Elmer
Elektrophoresekammer	CHEF-DR III System, Biorad
Fotodokumentation	Sony Color-Videoprinter UP-5000
Geldokumentation	Polaroid MP 4 + Instant Camera
Gaschromatographie	GC Shimadzu GC-14 A
GC Säulen	Hewlett Packard Ultra 1 0.2 µm x 25 m, bestehend aus vernetztem Polydimethylsiloxan
Labormixgerät	Waring Products, New Hartford Connecticut, USA
Magnetrührer	Heidolph MR 3003
Mikroskope	1. Carl Zeiss Axioskop, G42-110D 2. Carl Zeiss Axiophot, G42-250D
pH-Meter	Knick 765 Calimatic
Photometer	1. Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer, Lambda 2 2. Ultraspec II, LK 13, Biochrom
Rotationsverdampfer	Büchi, Rotavapro-R
Sterilbank	Heraeus HLB 472 GS
Speed-Vak	Univapo 150 H
Ultra Turax-Gerät	Janke und Kunkel KG
UV-Schirm (Gel-Betrachtung)	Pharmacia Makro Vue
UV-Lampe	Universal UV-Lampe, Camag TL
Vortex	Vibrifix VF1 Janke und Kunkel KG
Waage	Sartorius MC1 Laboratory LC
Wasserbadschüttler	GFL-1083
Zentrifugen	1. Heraeus Minifuge T, Sepatech 2. Beckmann J2-21 3. Mikrozentrifuge 5415C, Eppendorf

2.1.4 Verwendete Software, Datenbanken und Internetadressen

Bearbeitung der Sequenzen	-Chromas 2.1
Herstellung von Alignments	-ClustalX und ClustalW
Entwicklung PCR-Primer	-Primer Select

GC-Analyse	-Chromatography Software for Windows, DataApex
PC Bildbearbeitung	-Image Pro Plus
BLAST (Basic Local Alignment Tool) des NCBI-National Center for Biotechnology Information	- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
EMBL-Datenbank	- http://www.ebi.ac.uk/embl/
ExPASy Molecular Biology Server	- http://www.expasy.ch
ORF Finder	- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html
GeneMark	- http://www.ebi.ac.uk/genemark/

2.1.5 Restriktions-Endonukleasen

1. <i>AscI</i> , NE BioLabs	4. <i>PacI</i> , NE BioLabs	7. <i>SpeI</i> , NE BioLabs
2. <i>EcoRI</i> , NE BioLabs	5. <i>PmeI</i> , NE BioLabs	8. <i>SwaI</i> , NE BioLabs
3. <i>NotI</i> , NE BioLabs	6. <i>Sau3A</i> , NE BioLabs	9. <i>SfiI</i> , NE BioLabs

Alle Restriktions-Endonukleasen wurden vom Hersteller mit dem entsprechenden Puffer geliefert. Dieser war in der Regel zehnfach konzentriert und mußte vor Gebrauch um diesen Faktor verdünnt werden. Die Zugabe von DTT und BSA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.1.6 Primer

Tab. 1. Primer. Nukleinsäure-Sequenzen der eingesetzten Primer und deren Schmelzpunkte (T_m: 2 AT + 4 GC).

Primer	Funktion	DNA-Sequenz (5'-3')	Target-DNA	T _m
M13 F (-20)	PCR Sequenzierung	GTA AAA CGA CGG CCA GT	universell	52°C
M13 R	PCR Sequenzierung	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	universell	54°C
F27-455	Sequenzierung	CAA TGC ATT CAG GAA CAG C	kloniertes Insert <i>Primer Walking</i>	56°C
F27-700	Sequenzierung	AAC GTG CCG TTC GTG CT	kloniertes Insert <i>Primer Walking</i>	54°C
F27-1000	Sequenzierung	GCA GTG ATG CGG TCG ATA AA	kloniertes Insert <i>Primer Walking</i>	60°C
PPest-PCR-F	PCR Sequenzierung	GGC CGT ATG GCG CAA TA	<i>P. pabuli</i> M1 Esterase-Gen	54°C
PPest-PCR-R	PCR	TCT GCT CTA TAA GCA GGC	<i>P. pabuli</i> M1 Esterase-Gen	54°C
PPest512-F	Sequenzierung	ATG GGA ATT ACA GCA TGT G	<i>P. pabuli</i> M1 Esterase-Gen	54°C
PPest837F	Sequenzierung	ACA GGC TTC GGT CGA AC	<i>P. pabuli</i> M1 Esterase-Gen	54°C
R27-150	Sequenzierung	CCG GCT GCA TGG CCA TCA T	kloniertes Insert <i>Primer Walking</i>	62°C
R27-450	Sequenzierung	GCA TGC ACG ACG ATA CGG CAT TT	kloniertes Insert <i>Primer Walking</i>	60°C
R27-850	Sequenzierung	GCT CGC AGC GCT TCA GCT T	kloniertes Insert <i>Primer Walking</i>	62°C
R27-1250	Sequenzierung	GCC GCT CTA GAA CTA GTG GAT	kloniertes Insert <i>Primer Walking</i>	64°C

F: Forward Primer, **R:** Reverse Primer.

2.1.7 Kits

Cycle Sequencing	ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Perkin Elmer
DNA-Präparation	QIAGEN®, Genomic DNA Buffer Set und Genomic-Tips 100/G
DNA-Aufreinigung	Prep-A-Gene® DNA Purification Systeme: Glasmilch, Wasch- und Bindungs-Puffer, TE-Puffer, Bio-Rad Laboratories
PCR	dNTPs (Deoxynucleoside Triphosphate) Set, Roche
Proteinbestimmung	Taq, DNA Polymerase, 250 Units, Roche Protein Assay Kit, Sigma

2.1.8 Klonierung

Vektoren	pBluescript® II SK (+) Pagemid, Stratagene
Kompetente Zellen	XL10-Gold® Ultracompetent Cells, Stratagene
Alkaline Phosphatase	Calf Intestine Alkaline Phosphatase, 70 U/μl, Stratagene
Ligase	T4 Ligase, 4 U/μl, Stratagene
X-Gal	50 mg/ml, Promega
IPTG	Promega

2.1.9 Mikroorganismen

Tab. 2. Mikroorganismen.

	Name	Stamm-Bezeichnung	Literatur
1	<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM 13 ^T	Brune und Götz (1992)
2	<i>Escherichia coli</i> K 12	DSM 498	Brune und Götz (1992)
3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50090 ^T	McKellar (1986)
4	<i>Serratia marcescens</i>	DSM 30121 ^T	Winkler u. Stuckmann (1979)
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20714 ^T	Brune und Götz (1992)
6	<i>Paenibacillus pabuli</i> M1	DSM 10049	Detering (1995)
7	<i>Bacillus</i> sp. C und P	DSM 10046, DSM 10050	Detering (1995)

2.1.10 Lipasen

1. Lipase aus *Aspergillus niger*, Novo
2. Lipase aus *Candida cylindracea*, Sigma
3. Lipase aus *Rhizopus arrhizus*, Sigma
4. Lipase aus *Candida rugosa*, Sigma

2.1.11 Medien

Falls in den folgenden Abschnitten nicht gesondert darauf hingewiesen wird, sind alle Nährmedien mit destilliertem Wasser angesetzt, für 20 Minuten bei 121°C und 1 bar Überdruck im Autoklaven sterilisiert worden.

2.1.11.1 Definierte Medien

Mineralsalz-Medium nach Brunner (DSM-Medium 457)

Na ₂ PO ₄	2.44 g
KH ₂ PO ₄	1.52 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.50 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.20 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.05 g
Spurenelement-Lösung-4	10 ml
H ₂ O	1000 ml
pH 6.9	

SL-4: Spurenelement-Lösung 4

EDTA	0.5 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.2 g
Spurenelement-Lösung-6	100 ml
H ₂ O	900 ml

SL-6: Spurenelement-Lösung 6

ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0.10 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0.03 g
H ₃ BO ₃	0.30 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0.20 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0.01 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0.02 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.03 g
H ₂ O	1000 ml

Nach dem Einstellen des pH-Wertes und Autoklavieren wurde dieses Mineralsalzbasis-Medium mit einer Kohlenstoffquelle entsprechender Konzentration versehen.

2.1.11.2 Komplexe Medien

Casein-Sojamehlpepton-Agar

Dieses Komplexmedium diente der Stammhaltung und der Herstellung von Vorkulturen. Einer Menge von 1000 ml Casein-Sojamehlpepton-Bouillon wurden 15 g Agar hinzugefügt.

Casein-Sojamehlpepton-Bouillon (Merck 5459)

Dieses Medium wurde zur Herstellung von Vorkulturen und zur Produktion von Biomasse benutzt.

Casein-Sojamehlpepton-Bouillon:

Pepton aus Casein.....	17 g
Pepton aus Sojamehl	13 g
Glucose.....	2.5 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g
H ₂ O.....	1000 ml
pH 7.2- 7.5	

Nutrient Agar: FP-(Fleisch Pepton) oder NB-(Nutrient Broth) Agar

Nutrient Broth (Difco 3-01-6)	8 g
Agar (Oxoid No. 1)	15 g
H ₂ O	1000 ml
pH 6.0	

Nutrient Broth (Difco 3-01-6)

Fleischpepton.....	5 g
Fleischextrakt	3 g
H ₂ O	1000 ml
pH 6.8	

FP[±]-Medium: Sporulationsmedium (DSM-Medium 1)

Ein komplexes Nährmedium, das durch den Zusatz von Mangan Endosporen-bildende Organismen zur Ausprägung dieses Merkmals anregt.

Nutrient Broth (Difco 3-01-6)	6 g
MnSO ₄	5 mg
H ₂ O	1000 ml
pH 7.0	

2.1.11.3 Nachweis von lipolytischer Aktivität

Kakaobutter-AgarplattenGrundmedium:

Pepton	11.1 g
NaCl	5.5 g
Agar	16 g
H ₂ O	900 ml

Fett-Komponente

Kakaobutter (2.1.2.2).....	5 g
----------------------------	-----

Beide Komponenten wurden getrennt voneinander autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf mindestens 50°C wurden sie in einem sterilen Mixer für ca. 2 Minuten homogenisiert. Anschließend wurden aus der so hergestellten Emulsion Agarplatten gegossen.

Pflanzenöl-Agarplatten

Entsprechend den Angaben über Kakaobutter-Agarplatten wurde auch dieses Medium angefertigt. Die Kakaobutter wurde durch ein handelsübliches Pflanzenöl (2.1.2.2) ersetzt.

Rhodamin B-Agarplatten

Das Verfahren wird zur Darstellung von Lipase-Aktivität benutzt und geht auf eine Beschreibung von Kouker und Jaeger (1987) zurück.

Grundmedium:

Nutrient Broth	8	g
NaCl	4	g
Agar	10	g
H ₂ O.....	1000	ml

Dieses Grundmedium wurde getrennt von den anderen Komponenten bei 121°C und 1 bar Überdruck für 20 Minuten autoklaviert.

Rhodamin B-Stammlösung

20 mg Rhodamin B wurden in 20 ml Wasser gelöst und anschließend sterilfiltriert.

Pflanzenöl-Komponente

31.25 ml Pflanzenöl wurden für 20 Minuten und 1 bar Überdruck bei 121°C autoklaviert. Die Pflanzenöl-Komponente wurde zunächst durch Säulen-Chromatographie (2.2.3) nach einer Beschreibung von Jensen (1983) aufgereinigt. Anschließend erfolgte der Nachweis freier Fettsäuren mittels Dünnschicht-chromatographischer Analyse (2.2.4).

Nach Fertigstellung aller Komponenten wurden 1000 ml Medium mit 31.25 ml Pflanzenöl und 10 ml Rhodamin B-Stammlösung versehen. Der Nachweis lipolytischer Aktivität erfolgte nach der Kultivierung durch Bestrahlung der Platten mit UV-Licht einer Wellenlänge von 350 nm.

Spirit Blue-Agar

Zur Herstellung dieses Mediums waren zwei verschiedene Komponenten notwendig, ein *Lipase*-Reagenz (Difco 0431-63-3) und ein *Spirit Blue*-Agar (Difco 0950-17-1). Der Agar setzte sich wie folgt zusammen:

Bacto Trypton.....	10	g
Bacto Hefeextrakt.....	5	g
Bacto Agar	20	g
Spirit Blue	0.15	g

Die oben angeführte Inhaltsangabe gibt die Zusammensetzung in 1 l Medium wieder. Dabei wurden 35 g *Spirit Blue*-Agar in 1 l Wasser gelöst. Diese Medienkomponente wurde bei 121°C und 1 bar Überdruck für 15 Minuten autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50°C wurden 30 ml *Lipase*-Reagenz hinzugefügt und anschließend Platten gegossen.

Tributylin-Agarplatten

Die Anfertigung der Platten erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das Medium setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, der *Tributylin Agar Base* (MERCK 1957) und *Glycerintributylin* (MERCK 1958).

Tributylin Agar Base (g/Liter)

Pepton aus Fleisch.....	2.5 g
Pepton aus Casein	2.5 g
Hefeextrakt	3 g
Agar	12 g

Der Hersteller gibt an, beide Komponenten unter häufigem Schütteln gut miteinander zu mischen. Es hatte sich jedoch gezeigt, daß bessere Resultate erzielt werden konnten, wenn beide Komponenten für ca. 2 Minuten mittels eines Labormixgerätes behandelt wurden.

Hydrolyse von Tween 80

Bei Hydrolyse der Verbindung kommt es zur Bildung einer kristallinen Ausfällung, die aus den Calcium-Salzen der Fettsäuren besteht. Diese Methode wurde erstmals von Sierra (1957) beschrieben .

Grundmedium:

Pepton	10 g
NaCl.....	5 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.1 g
Agar	15 g
H ₂ O	900 ml
pH 7.0	

Tween-Komponente:

Tween 80	10 g
H ₂ O	100 ml

Beide Komponenten wurden getrennt voneinander autoklaviert und nach Abkühlen auf mindestens 50° C zusammengegeben. Die daraus hergestellten Agarplatten wiesen eine Endkonzentration der Tween-Verbindung von 1% auf. Sie wurden punktförmig beimpft und über einen Zeitraum von 14 Tagen bei einer Temperatur von 28°C inkubiert.

Hydrolyse von Tween 20, 40 und 60

Die Herstellung dieser Medien erfolgte analog zur Anfertigung von Tween 80-Platten.

2.1.11.4 Medien zur Ermittlung von lipolytischer Aktivität im Kulturüberstand

Fer/2-Medium

Dieses Medium geht auf eine Untersuchung von Voit *et al.* (1991) zurück. Da es sich durch seinen erhöhten Peptongehalt sehr dunkel färbte und sich dieser Sachverhalt bei der photometrischen Ermittlung der Lipase-Aktivität störend auswirkte, wurde mit der halben Konzentration aller Bestandteile gearbeitet.

Hefeextrakt	40 g
Trypton	10 g
Glucose	2.5 g
Na ₂ HPO ₄	0.25 g
H ₂ O	1000 ml
pH 7.0	

PHP_{ÖL}-Medium (Pepton Hefeextrakt Phosphat-Medium mit Öl)

Pepton	10 g	
KH ₂ PO ₄	1 g	
Hefeextrakt	2 g	
Pflanzenöl	10 ml	Endkonzentration: 1%
H ₂ O	990 ml	
pH 7.0		

Alle Komponenten wurden gemeinsam bei 121°C und 1 bar Überdruck für 20 Minuten autoklaviert.

2PHP₄₀-Medium

Der Name dieses Mediums bezieht sich darauf, daß im Gegensatz zum PHP-Medium von allen Bestandteilen die doppelte Menge eingesetzt wurde. Außerdem wurde zur Induktion von Lipasen Tween 40 entsprechend einer Endkonzentration von 0.5 Prozent hinzugefügt.

Grundmedium

Pepton	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Hefeextrakt	2 g
H ₂ O	475 ml

Tween-Komponente

Tween 40	10 g
H ₂ O	100 ml

Beide Komponenten wurden getrennt voneinander autoklaviert. Danach wurden 25 ml der 10%igen Tween 40-Lösung zugegeben.

2PHP₄₀-Medium mit Glucose

Dem 2PHP₄₀-Medium wurde Glucose entsprechend einer Endkonzentration von 0.5% hinzugefügt.

2.1.11.5 Caseinabbau-Medium: Nachweis proteolytischer Aktivität

Skim Milk-Komponente

Skim Milk.....	50 g
H ₂ O	500 ml

Agar-Komponente

Hefeextrakt.....	1 g
NaCl.....	5 g
Agar	10 g
H ₂ O	500 ml
pH 7.0	

Beide Komponenten wurden bei 115°C für 13 Minuten autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 50°C miteinander gemischt. Anschließend wurden aus dem Medium Platten gegossen. Eine positive Reaktion zeigte sich durch die Bildung klarer Höfe um die Kolonien herum.

2.1.11.6 Medien für die Klonierung

NZY[±] Broth

Die Transformation der kompetenten Zellen erfolgte in NZY⁺ Broth.

NZ Amine (Sigma, C 0626)	10 g
Hefeextrakt.....	5 g
NaCl.....	5 g
H ₂ O	1000 ml
pH 7.5	

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7.5 eingestellt und nach Abkühlen auf 55°C wurden folgende Bestandteile zugegeben:

1. 12.5 ml 1M MgCl₂
2. 12.5 ml 1M MgSO₄
3. 20 ml Glucose, 20% (w/v), sterilfiltriert

LB-Ampicillin Agar

Das Blue-White Color Screening der ausplattierten transformierten Zellen wurde auf LB-Medium- (Luria Bertani) durchgeführt. Damit werden Klone, die ein Konstrukt aus Plamid mit legiertem Insert aufgenommen haben an der weißen Farbe der Kolonien und von denen die ein Plamid ohne Insert aufweisen an der blauen Farbe unterschieden. Die Zugabe von Ampicillin bewirkt, daß nur diejenigen Zellen zum Wachsen kommen, die ein Plamid aufgenommen haben und dadurch die Eigenschaft der Ampicillinresistenz besitzen.

Trypton	10 g
NaCl.....	10 g
Hefeextrakt.....	5 g
H ₂ O	1000 ml
pH 7.0	

Der pH-Wert wurde mit 5 N NaOH auf 7.0 eingestellt und nach Abkühlen auf 55°C erfolgte die Zugabe von:

1. X-Gal: Endkonzentration von 80µg/ ml Medium
2. IPTG: Endkonzentration von 40mM IPTG
3. Ampicillin: 100µl/ml Medium

Die Platten waren mit den angegebenen Zusätzen über einen Zeitraum von ca. zwei Wochen im Kühlschrank bei 4°C haltbar.

2.1.11.7 Medien zur Untersuchung des aeroben Fettsäure-Abbaus

Mineralsalzbasis-Fettsäure-Medium

Mineralsalzbasis-Medium (2.1.11.1)	20 ml
Hefeextrakt (0.1%)	0.12 ml
Spurenelement-Lösung 4 (2.1.11.1)	0.20 ml
Vitamin-Lösung (DSM-Medium 428)	0.05 ml

Mineralsalzbasis-Fettsäure-Medium und Glucose (0.5%)

Mineralsalzbasis-Medium (2.1.11.1)	19 ml
Glucose (10%)	1 ml
Hefeextrakt (0.1%)	0.12 ml
Spurenelement-Lösung 4 (2.1.11.1)	20 ml
Vitamin-Lösung (DSM-Medium 428)	0.5 ml

2PHP-Medium Fettsäuremedium (Gum arabicum und Deoxycholsäure)

Pepton, Trypticase Peptone BBL (2%)	10 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
Hefeextrakt (0.4 %)	2 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.1 g
H ₂ O	475 ml

Als Emulgatoren für die eingesetzten Fettsäuren wurden 500 mg Gum arabicum und 1 g Deoxycholsäure in 25 ml Wasser gelöst und anschließend steriltrifert. Die Endkonzentration im Medium an Gum arabicum betrug 0.1% und an Deoxycholsäure 0.5%. Die Zugabe der Fettsäuren entsprach den Angaben unter 2.2.8.1.1.

2.1.12 Puffer

Citrat-Puffer

Zitronensäure.....9.2 g
NaOH.....9.0 g
H₂O.....1000 ml

Der Puffer wurde mit NaOH, 2 N auf einen pH-Wert von 5.5 eingestellt.

Gel Ladungs-Puffer (Agarose-Gele)

Glycerin, reinst.....3 ml
EDTA, 0.5 M.....2 ml
H₂O.....5 ml

Die Bestandteile des Puffers wurden gut miteinander gemischt und anschließend wurden 25 mg Bromphenolblau zugegeben.

Gel Ladungs-Puffer (Sequenzierung)

Formamid, reinst.....150 ml
EDTA, 0.05 M.....30 ml

Phosphat-Puffer

KH₂PO₄.....6.8 g
K₂HPO₄.....11.4 g
H₂O.....1000 ml
pH 6.8

Tris-Phosphat-Puffer

Tris.....36 mM
NaH₂PO₄.....30 mM
pH 7.2

Zitronensäure-Phosphat-Puffer

Zitronensäure.....0.1 M
Na₂PO₄.....0.2 M
pH 6.0

10xTBE-Puffer

Tris Base.....107.8 g
Borsäure.....55.0 g
EDTA.....7.4 g

Die Bestandteile dieses Puffers wurden nach dem Einwiegen mit Wasser auf ein Volumen von 1000 ml aufgefüllt. Eine exakte Einstellung des pH-Wertes erfolgte nicht zusätzlich.

2.1.13 Reagenzien für die PFGE

Reaktionspuffer für die Restriktions-Endonukleasen

Die Reaktionspuffer für die Restriktions-Endonukleasen (2.1.5) sind spezifisch für jedes Enzym zusammengesetzt. Sie werden vom Hersteller mitgeliefert und müssen aber entsprechend dessen Angaben verdünnt werden. Die Zusatzkomponenten DTT und BSA wurden ebenfalls nach Angaben des Herstellers jeweils vor Reaktionsbeginn hinzugefügt. Wenn nicht explizit darauf hingewiesen wird, wurden alle angeführten Puffer-Lösungen mit demineralisiertem Wasser angesetzt und für 20 Minuten im Autoklaven bei 121°C und 1 bar Überdruck sterilisiert.

Saline EDTA-Puffer

NaCl..... 2.19 g
EDTA III..... 0.93 g
H₂O.....250 ml
pH 8.0

Sarkosin-EDTA-Puffer (SE-Puffer)

EDTA.....0.5 M
Na-Lauryl-Sarkosin.....1.0 %
pH 7.5-8.0

10xTBE-Puffer (TBE-Puffer, zehnfach konzentriert)

Tris..... 107.8 g
Borsäure.....55.0 g
EDTA, 0.5 M.....4.0 ml

Die Bestandteile dieses Puffers wurden mit Wasser auf ein Volumen von 1000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nicht gesondert eingestellt.

0.5 TBE-Puffer

Zur Herstellung von 0.5fachen TBE-Puffer wurde der zehnfach konzentrierte Ansatz um einen Faktor von 20 mit sterilem demineralisierten Wasser verdünnt.

TE-Puffer

Tris-HCl.....10 mM
EDTA.....10 mM
pH 7.5

Lysozym-Lösung

Lysozym wurde entsprechend einer Konzentration von 1 mg/ml in SE-Puffer angesetzt.

Proteinase K-Lösung

Die Endkonzentration der Proteinase K im Ansatz wurde mit 5.0 ml SE-Puffer auf 0.5 mg/ml eingestellt.

2% Agarose

2 g Agarose (Low Melting Point Agarose) wurde in 100 ml SE-Puffer entsprechend einer Konzentration von 2% angesetzt und autoklaviert.

DNA-Größenstandards

Während der durchgeführten Arbeiten hatte sich gezeigt, daß der *Low Range PFGE-Marker* (New England BioLabs) aus λ -DNA-Oligomeren und λ -*Hind III*-Fragmenten die zufriedenstellendsten Ergebnisse lieferte.

2.2 Methoden

2.2.1 Aufbewahrung von Bakterienstämmen

2.2.1.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung der Vertreter der Gattungen *Bacillus* bzw. *Paenibacillus* (Ash *et al.*, 1993) erfolgte in Schrägagar-Röhrchen auf Sporulationsmedium (2.1.9 und 2.1.11.2). Diese Kulturen wurden über einen Zeitraum von 1-2 Tagen bei 28°C inkubiert. Im Anschluß an die beobachtete Sporulation wurden die Röhrchen mit Parafilm verschlossen und waren so vor Austrocknung geschützt. Sie wurden bei 6°C gelagert. Nach 6 Monaten wurden neue Stammkulturen angelegt.

Bei den Bakterienstämmen, die keine Endosporen bildeten, wurde ein vergleichbares Verfahren angewendet. Es erfolgte ein Beimpfen der Kulturen in Schrägagar-Röhrchen auf Casein-Sojamehlpepton-Medium (2.1.11.2). Diese wurden 1-2 Tage bei 28°C inkubiert. Nachdem ausreichend Bewuchs festgestellt worden war erfolgte eine Lagerung im Kühlschrank bei 6°C. Nach zwei Wochen wurden neue Stammkulturen hergestellt.

2.2.1.2 Stammkonservierung

Für die Herstellung von Glycerinkulturen, ein häufig angewendetes Verfahren zur Konservierung von Bakterienstämmen, ist es notwendig, mit möglichst jungen Zellen zu arbeiten. Es wurden Casein-Sojamehlpepton-Flüssigkulturen (2.1.11.2) angefertigt und über Nacht bei 28°C inkubiert. Die Stammkonservierung erfolgte in Wheaton-Röhrchen (2.2.1.2). Diese fassen ein Volumen von 4 ml. Sie wurden mit 1 ml reinem, wasserfreiem Glycerin versehen. Nach dem Autoklavieren wurden 0.6 ml der zuvor hergestellten Bakterienkultur hinzugefügt und beide Komponenten gut miteinander gemischt. Diese Ansätze waren so bei -20°C unbegrenzt lagerbar.

2.2.1 Screening auf lipolytische Aktivität

Auf der Suche nach einem geeigneten Screening-Verfahren wurden die unter 2.1.11.3 angeführten Medien hergestellt. Zur Standardisierung dieser Tests wurden die benötigten Platten mit einem Volumen von 20 ml Medium gegossen. Es ergab sich dadurch eine konstante Schichtdicke, die eine Quantifizierung der lipolytischen Aktivität und einen Vergleich der unterschiedlichen Verfahren ermöglichte. Das Inokulum für die Kulturen wurde

auf Casein-Sojamehlpepton-Schrägagar-Röhrchen hergestellt (2.1.11.2). Diese Vorkulturen wurden jeweils 1 Tag bei 28°C bebrütet. Dann wurden die Zellen in steriler Saline suspendiert bis der Ansatz einem McFarland Standard von 2 entsprach. Die Platten wurden mit diesem Inokulum punktförmig beimpft und über einen Zeitraum von 8 Tagen bei 28°C bebrütet.

2.2.3 Säulenchromatographische Reinigung von Triglyceriden

Dieses Verfahren basiert auf einer Beschreibung von Jensen (1983). Es wurden 10 g Fett, 20 g Aluminiumoxid und 200 ml Petroleumbenzin eingesetzt. Zunächst wurde das aufzureinigende Fett in einer geringen Menge Petroleumbenzin (30-60°C) gelöst. Die für dieses Verfahren benutzte Glassäule der Firma Rettberg, Göttingen, war 50 cm lang und wies einen Innendurchmesser von 3 cm auf. Ein geringer Teil der vorgesehenen Gesamtmenge Aluminiumoxid wurde in Petroleumbenzin suspendiert und auf die Säule gegeben. So wurde weiter verfahren, bis die Säule mit der gesamten Menge Aluminiumoxid homogen gepackt war. Das in Petroleumbenzin gelöste Pflanzenöl wurde nun auf die Säule gegossen und anschließend die entsprechende Menge Petroleumbenzin zur Elution der Triglyceride hinzugefügt. Die gelösten Triglyceride wurden aufgefangen und in einen geeigneten Rundkolben überführt. Dann wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer unter Annäherung von Vakuumbedingungen und bei 40°C Wasserbad-Temperatur entfernt.

2.2.4 Dünnschicht-chromatographische Untersuchungen an natürlichen Fetten

Das Vorhandensein freier Fettsäuren und Di- sowie Monoglyceride in einem Gemisch aus Triglyceriden wurde mittels Dünnschicht-chromatographischer Analyse nachgewiesen. Dazu wurden ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄ Platten der Marke Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland verwendet. Diese Dünnschicht-Platten wurden auf ein Format von 5x10 cm zurechtgeschnitten. In einem Abstand von einem Zentimeter wurden mittels einer ausgezogenen Pasteurpipette jeweils 1, 2, 3 und 4 Tropfen einer Lösung bestehend aus 50 mg Fett-Komponente und 1 ml tertiärem Butylmethylether (tBME) aufgetragen. Anschließend erfolgte die Trennung der Substanzen in einem Fließmittel aus Hexan und tBME. Beide Lösungsmittel wurden in einem Verhältnis von 9:10 miteinander gemischt. Dabei entsprachen die Laufzeiten ca. 30 Minuten.

Der Nachweis erfolgte durch Aufsprühen von 3 ml Farbreagenz. Dieses bestand aus 50 g Dodekamolybdatophosphorsäure in 1 l Ethanol. Anschließend wurden die Platten für mindestens 15 Minuten in einem Ofen bei 160°C erhitzt.

2.2.5 Protein-Fällung

2.2.5.1 Fällung mittels kristallinem Ammoniumsulfat

Eine der am häufigsten benutzten Methoden zur Konzentrierung von Proteinen ist eine Fällung mit Hilfe anorganischer Salze, z.B. Ammoniumsulfat. Zunächst wurden 25 ml Medienüberstand fein gemörsertes Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 90% zugegeben. Maßgebend für die hinzugefügten Mengen war die Sättigungstabelle von Cooper (1980). Um den pH-Wert des Ansatzes konstant zu halten, wurde zunächst eine Spatelspitze Tris vorgelegt. Dabei wurde eine mögliche Denaturierung der Proteine vermieden, indem der Ansatz während des gesamten Vorganges langsam gerührt und in einem Eisbad gekühlt wurde. Um eine vollständige Einstellung des Gleichgewichtes zu erreichen, wurde nach Beendigung der Ammoniumsulfat-Zugabe für mindestens 30 Minuten weitergerührt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Probe für 30 Minuten bei 20.000 rpm. Die dadurch erhaltenen Pellets wurden in einem definierten Volumen Phosphat-Puffer aufgenommen. Um das Ammoniumsulfat zu entfernen, wurde der Ansatz anschließend in Millipore Ultrafree-15-Einheiten (Millipore UFV4 BGC 25) überführt und erneut für 30 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Das in dieser Weise erhaltene Pellet wurde erneut in Phosphat-Puffer (2.1.12) resuspendiert.

2.2.5.2 Fällung mittels gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung

Ein schonendes Verfahren der Fällung von Proteinen besteht in der Zugabe einer gekühlten und gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung. 188.1 g Ammoniumsulfat wurden unter Verwendung eines Magnetrührers langsam in 250 ml Wasser gegeben und mindestens weitere 30 Minuten gerührt bis kein Salz mehr in Lösung ging. Anschließend wurde der pH-Wert auf einen Wert von 7 eingestellt und die gesättigte Lösung bei 4°C im Kühlraum gelagert.

Um eine Sättigung von 50% zu erreichen war es notwendig, einem Ansatz von 100 ml das gleiche Volumen an gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung hinzuzufügen. Zur Stabilisierung des pH-Wertes wurde zunächst eine Spatelspitze Tris vorgelegt. Unter ständigem Rühren wurde anschließend im Eisbad die auf ca. 4°C temperierte Ammoniumsulfat-Lösung tropfenweise zugegeben.

2.2.6 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes erfolgte mittels eines Protein Assay Kits der Firma Sigma (Nr. P 5656). Das Verfahren, eine Methode nach Peterson (1977), beruht auf einer Modifikation des Protein-Nachweises von Lowry (1951). Die Änderung besteht im wesentlichen aus einer Fällung der untersuchten Proteine mittels Deoxycholsäure, Trichloressigsäure und Phenol. Durch dieses Verfahren werden Interferenzen mit anderen Substanzen, z.B. Medienbestandteilen, EDTA oder Ammoniumsulfat vermieden. Der Nachweis der Proteinkonzentration beruht darauf, daß ein alkalisches Kupfertartrat-Reagenz komplexe Verbindungen mit Peptidbindungen eingeht. Nach Zugabe einer Phenol-Komponente entsteht ein violetter Farbstoff, dessen Konzentration bei einer Wellenlänge von 750 nm im Photometer bestimmt wird.

Aufgrund erheblicher Schwankungen in den verschiedenen Ansätzen hatte es sich als günstig erwiesen, bei jeder Proteinbestimmung einen Serum Albumin-Standard mitzuführen.

2.2.7 Lipase-Assay

2.2.7.1 Emulgationsverfahren

Die Stabilität von β -substituierten Naphtholverbindungen wurde in Gegenwart von Wasser und zwei unterschiedlichen Emulgatoren geprüft. Zum einen wurde ein Thesit-Dioxan-Gemisch und zum anderen Tween 60 getestet. Später wurden zwei weitere Methoden auf ihre Eignung untersucht.

2.2.7.1.1 Thesit-Dioxan

Zunächst wurde β -Naphthylstearat in einer Konzentration von 0.08 M mit tBME gemischt. 100 μ l wurden von diesem Ansatz entnommen und mit 100 μ l Thesit-Dioxan versehen. Anschließend wurden 100 μ l Wasser hinzugefügt.

2.2.7.1.2 Tween 60

Die Enzysubstrat-Komponente wurde wie oben beschrieben hergestellt (2.2.7.1.1). Die Emulgation erfolgte durch Zugabe von 100 μ l einer 10%igen Tween 60-Lösung (w/v) und weiteren 100 μ l Wasser.

2.2.7.1.3 β -Naphthylstearat in Gegenwart von Wasser

Die Herstellung der β -Naphthyl-Komponente entsprach den beiden vorangegangenen Versuchsanordnungen (2.2.7.1.1). Diesem Ansatz wurden anschließend 200 μ l Wasser hinzugefügt.

2.2.7.1.4 α -Naphthylstearat in Gegenwart von Lecithin-Glycerin

Zur Überprüfung der Stabilität von α -Naphthylstearat wurde eine Lipase aus *Candida cylindracea* der Firma Sigma (2.1.10) eingesetzt. Die Herstellung der Substrat-Emulsion erfolgte wie unter (2.2.7.1.5) beschrieben. Dann wurde die verwendete Lipase aus *Candida cylindracea* in einer Konzentration von 0.4 M in Phosphat-Puffer angesetzt. Die Reaktion wurde gestartet, indem jeweils zu gleichen Teilen 500 μ l Enzymsubstrat-Emulsion und 500 μ l der Lipase-Komponente miteinander gemischt wurden. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf dem Schüttler für 2 Stunden bei 37°C. Der Nachweis von freiem 1-Naphthol wurde durch die Zugabe von jeweils 500 μ l Zym A und B (2.2.7.2) geführt. Die Kontrolle bestand aus 500 μ l Phosphat-Puffer und der genannten Menge Substrat-Emulsion.

2.2.7.1.5 Lecithin-Glycerin-Emulsion

Dieses Emulgationsverfahren beruht auf einer Methode von Haslbeck (1985). Die Enzymsubstrate wurden zunächst in einer Konzentration von 0.06 M in tertButylmethylether gelöst (2.1.1: 43-51). Eine 0.06 M Lecithin-Lösung wurde ebenfalls in tBME angesetzt. 0.32 ml der α -Naphthyl-Komponente wurden mit 0.87 ml der Lecithin-Komponente gemischt. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter einem Strom von Stickstoff entfernt. Nach der Zugabe von 0.8 ml Ethanol, absolut, wurden alle Bestandteile noch einmal gemischt und es erfolgte daraufhin eine Zugabe von 20 ml wasserfreiem Glycerin. Die Emulsion wurde für 2 Minuten mit dem Ultra Turrax-Gerät behandelt und dann für 15 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert.

2.2.7.1.6 Gum arabicum-Deoxycholsäure-Emulsion

Diese Methode der Emulgation hydrophober Lipase-Substrate nach Winkler und Stuckmann (1979) verwendet im wesentlichen Deoxycholsäure und Gum arabicum. Dazu wurde das eingesetzte Enzymsubstrat zunächst entsprechend einer Endkonzentration von 0.07 M in 10

ml 2-Propanol gelöst (2.1.1: 43-51). Anschließend wurden 207 mg Deoxycholsäure und 100 mg Gum arabicum in 90 ml Phosphat-Puffer eingewogen. Dann wurden beide flüssigen Komponenten miteinander gemischt und für ca. 2 Minuten mit dem Ultra-Turrax-Gerät auf höchster Stufe behandelt. Zum Entfernen der entstandenen Gasblasen wurde der gesamte Ansatz anschließend bei 3000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert.

2.2.7.2 Nachweis von 1-Naphthol

Zum Nachweis von freiem 1-Naphthol wurden zwei Reagenzien verwendet:

ZYM A	Tris25 g
	HCl (37%).....11 ml
	SDS10 g
	H ₂ O.....100 ml
ZYM B	0.35 g Fast Blue BB Salz (Sigma F 0250, Practical Grade) wurden in 100 ml Methanol eingewogen. Anschließend wurden beide Komponenten auf dem Rührer für 5 Minuten gelöst. Mit einem Faltenfilter wurden die nichtgelösten Salze entfernt.

Nach Zugabe der Komponenten ZYM A und B wurde der Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit einer sehr lichtstarken Lampe der Marke Ventilux (2.1.3) behandelt. Durch diese Bestrahlung mit Licht aus dem sichtbaren Bereich wurden die im Überschuß vorliegenden Farbstoff-Moleküle zerstört. Anschließend erfolgte eine photometrische Messung bei 580 nm. Der Nullwert wurde durch Mischen von Puffer und Enzymsubstrat-Emulsion im Verhältnis 1:2 bestimmt.

2.2.7.3 Enzym-Kinetiken

2.2.7.3.1 Extrazelluläre lipolytische Aktivität

Zunächst wurden die untersuchten Organismen in einer 100 ml 2PHP₄₀-Flüssigkultur (2.1.11.4) auf dem Schüttler bei einer Temperatur von 28°C für 5 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 40 Minuten bei 5000 rpm entfernt. Nach dem Abtrennen des so gewonnenen Kulturüberstandes von der Biomasse wurde diesem in einer vom Hersteller angegebenen Konzentration ein Protease Inhibitor-Cocktail hinzugefügt (2.1.1). Der Kulturüberstand war in dieser Form bei einer Temperatur von 4°C über einen Zeitraum von 14 Tagen lagerbar.

Anschließend wurden verschiedene Enzymsubstrat-Emulsionen (2.2.7.1.6) hergestellt und mit dem Kulturüberstand gemischt, indem von jeder Komponente jeweils 1 ml eingesetzt

wurde. Diese Ansätze wurden dann über einen Zeitraum von 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150 und 180 min im Wasserbadschüttler bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von jeweils 500 µl Zym A und B und Bestrahlung mit einer sehr lichtstarken Lampe erfolgte eine photometrische Messung bei 580 nm (2.2.7.2).

2.2.7.3.2 Zelluläre lipolytische Aktivität

Zum Nachweis einer zellulären lipolytischen Aktivität wurde *Paenibacillus pabuli* M1 über einen Zeitraum von 6 Tagen bei 28°C auf 2PHP₄₀-Platten inkubiert (2.1.11.4). Es hatte sich gezeigt, daß die zugegebene Tween 40-Komponente nach der Bearbeitung mit der French Press die anschließende photometrische Messung störte. Aus diesem Grund wurden die Zellen auf einem festen Medium kultiviert.

Die Zellen wurden in sterilem Phosphat-Puffer aufgenommen. Um sie von dem Kulturüberstand zu trennen wurde bei 5000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt und anschließend ein Protease Inhibitor-Cocktail hinzugefügt (2.1.1). Das Aufbrechen der Zellen erfolgte durch die French Press. Der French-Vorgang wurde jeweils viermal nacheinander mit 1100 PSI-Einheiten durchgeführt. Während dieser Arbeiten wurden die Proben im Eisbad gekühlt. Anschließend wurde der so gewonnene Rohextrakt mit sterilem Phosphat-Puffer auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt.

Zur Durchführung der Kinetiken wurden jeweils 1 ml dieses Rohextraktes mit 1 ml Enzymsubstrat gemischt und über einen Zeitraum von 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min im Wasserbadschüttler bei 37°C inkubiert. Der Nachweis von freigesetztem 1-Naphthol erfolgte wie unter 2.2.7.2 beschrieben.

2.2.8 Gaschromatographische Analyse des aeroben Fettsäure-Abbaus

2.2.8.1 Kultivierung

2.2.8.1.1 Zugabe der Fettsäurekomponente in die Medien

100 mg der eingesetzten Fettsäure wurden in 2 ml tertButylmethylether gelöst und anschließend in ein Glasröhrchen mit Teflondeckel steriltriftriert. Entsprechend einer Endkonzentration von 0.1% im Medium wurde das Fettsäure-Ether-Gemisch dem Ansatz hinzugefügt. Anschließend wurden die so vorbereiteten Kulturgefäße für 10 Stunden in einen 37°C-Brutschrank gestellt, so daß der Ether durch die Wattestopfen abdampfen konnte und gleichzeitig die Sterilität der Kulturgefäße gewährleistet blieb.

2.2.8.1.2 Beimpfen der Kulturen

Die Organismen wurden zunächst auf Casein-Sojapeton-Platten für 1 Tag bei 28°C inkubiert (2.1.11.2). Dann wurden die Zellen in steriler Saline (0.85% NaCl) suspendiert bis der Ansatz einem McFarland-Standard von 2 entsprach. Für jedes Kulturgefäß wurden 100 µl als Inokulum benutzt.

2.2.8.1.3 Inkubation der Kulturen

Die Kultivierung der Ansätze erfolgte auf dem Schüttler bei einer Temperatur von 28°C über einen Zeitraum von 14 Tagen.

2.2.8.2 Gaschromatographische Analyse mittel- und langkettiger Fettsäuren

Die Methylierung und Extraktion von Fettsäuren einer Kettenlänge von C10:0 bis C18:2 wurde nach einer von Moss *et al.* (1988) beschriebenen Methode durchgeführt.

2.2.8.2.1 Zugabe eines internen Standards

Als Referenzfettsäuren und Kontrolle des Extraktions- und Methylierungsvorganges wurden Behensäure (C22:0) und Tridecansäure (C13:0) direkt vor der Aufarbeitung zugegeben. Entsprechend den Angaben unter (2.2.8.1.1) wurden diese beiden Fettsäuren den Ansätzen in den gleichen Mengen hinzugefügt wie die untersuchten Abbau-Fettsäuren.

2.2.8.2.2 Zugabe von Salzsäure

Durch die Zugabe von 0.4 ml einer 32%igen HCl wurden die Ansätze auf einen pH-Wert von 1.6 angesäuert. Durch diesen Arbeitsschritt wurde gewährleistet, daß die untersuchten Fettsäuren als freie Säuren im Ansatz vorlagen.

2.2.8.2.3 Extraktion der Fettsäuren

Die Extraktion erfolgte nach den Angaben von Bligh und Dyer (1959). Dem Ansatz wurden 50 ml Chloroform hinzugefügt und anschließend mehrfach kräftig geschüttelt. Des weiteren erfolgte die Zugabe von 40 ml einer 0.3%igen Saline-Lösung und 100 ml Methanol. Der Ansatz wurde erneut mehrfach geschüttelt und anschließend wurden 50 ml Chloroform

hinzugegeben. Nach Zugabe von weiteren 50 ml Saline wurde noch einmal geschüttelt und die untere chloroformhaltige Phase in einen Rundkolben überführt. Unter Annäherung von Vakuumbedingungen in einem Rotationsverdampfer der Marke Büchi (2.1.3) wurde anschließend das Lösungsmittel entfernt.

Durch Zugabe von 3 ml tBME wurden die im Rundkolben verbliebenen Fettsäuren aufgenommen und in ein Glasröhrchen mit Teflondeckel überführt. Sie wurden ein weiteres Mal unter einem Strom von Stickstoffgas eingeeengt und anschließend in exakt 6 ml tertButylmethylether gelöst. In dieser Form waren die Proben über einen Zeitraum von mehreren Wochen im Gefrierschrank bei -20°C haltbar.

2.2.8.2.4 Methylierung

Die anschließende Methylierung der Proben erfolgte nach den Angaben von Moss *et al.* (1988). Das Methylierungsreagenz setzte sich aus den Komponenten Methanol, tBME, konz. Schwefelsäure im Verhältnis 5:5:0.1 (Volumenanteile) zusammen.

Methylierung

1. Fettsäure-Extrakt, 30 μl
↓
2. Zugabe von 1 ml Methylierungsreagenz
↓
3. Erhitzen der Probe für exakt 15 Minuten auf 80°C
↓
4. Stoppen der Methylierungsreaktion im Eisbad
↓
5. Zugabe von 500 μl einer 10%igen NH_4HCO_3 -Lösung
↓
6. Entfernen der oberen tertButylmethylether-Phase und Überführen in ein GC-Vial
↓
7. Extraktion des verbleibenden Restes an Fettsäuren durch Zugabe von 500 ml tertButylmethylether
↓
8. Überführen der oberen Phase in das bereits vorhandene GC-Vial

2.2.8.2.5 Gaschromatographische Analyse

Für die gaschromatographische Auftrennung der Fettsäure-Methylester wurde ein Gerät der Firma Shimadzu (2.1.3) verwendet. Es arbeitet mit einer Hewlett Packard Ultra 1 Säule (Durchmesser 0.2 mm und 25 m Länge) sowie einem Flammenionisationsdetektor. Die Proben wurden mit Hilfe eines automatischen Probennehmers (Autosamplers) bereitgestellt. Dabei wurde ein Temperaturprogramm benutzt, das bei 130°C beginnt und anschließend

einen Gradienten von 4°C/min aufbaut bis es eine Temperatur von 320°C erreicht hat. Die Darstellung der Ergebnisse und die Auswertung der Daten erfolgte mittels einer *Chromatography Software for Windows* der Firma DataApex (2.1.4).

2.2.8.3 Gaschromatographische Analyse kurzkettiger Fettsäuren

Die Analyse kurzer Fettsäuren der Kettenlängen zwischen C3:0 und C10:0 entsprach den Angaben von Holdemann *et al.* (1977). Sie wurde modifiziert angewendet. Anstelle des bei Raumtemperatur sehr flüchtigen Diethylethers wurde der wesentlich stabilere tertiäre Butylmethylether eingesetzt. Als interner Standard diente Propionsäure. Die Zugabe dieser Fettsäuren erfolgte entsprechend den Angaben unter 2.2.8.1.1. Ansonsten wurde nach folgendem Schema verfahren:

1. Zentrifugation der Kultur bei 5000 rpm für 10 Minuten
↓
2. Überführen von 1 ml des Überstandes in ein Glasröhrchen
↓
3. Zugabe von 0.2 ml einer 50 %igen H₂SO₄-Lösung
↓
4. Zugabe von 0.4 g NaCl
↓
5. Schütteln des Ansatzes
↓
6. Zugabe von 1.0 ml tBME
↓
7. Schütteln des Ansatzes
↓
8. Überführen der oberen Phase in ein weiteres Glasröhrchen
↓
9. Einspritzen von 20 µl der Probe

2.2.8.3.1 Gaschromatographische Analyse

Die Auftrennung und Detektion der Fettsäuren erfolgte mit einem Gerät des Herstellers Shimadzu (2.1.3). Es wurde eine Säule bestehend aus Nukol verwendet, die eine Länge von 30 m und einen Durchmesser von 0.25 mm aufwies. Sie arbeitet mit einer gebundenen Phase vom Polyethylenglycol-Typ, der saure funktionelle Gruppen enthält und somit zur Auftrennung flüchtiger saurer Verbindungen geeignet ist.

Zur Trennung der Fettsäuren von C3:0 bis C6:0 wurde eine Temperatur von 180°C benutzt. Die Auftrennung der Fettsäuren C8:0 und C10:0 erfolgte bei 200°C.

2.2.9 Mutagenisierungen an *Paenibacillus pabuli* M1

2.2.9.1 Mutagenisierung mit UV-Strahlung

Gemäß den Angaben von Carlton und Brown (1981) wurden Zellen des untersuchten Organismus einer UV-Quelle über unterschiedliche Zeiträume ausgesetzt. Daraus wurde eine Lethalitätsrate für UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt (weitere Angaben zur Durchführung dieser Arbeiten finden sich unter 2.2.9.3).

2.2.9.2 Mutagenisierung mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG)

Zunächst wurde mit NTG-Endkonzentrationen von 100 µg/ml entsprechend den Angaben von Carlton und Brown (1981) gearbeitet. Später wurde dann die Konzentration auf 500 µg/ml erhöht und ebenfalls zunächst eine Lethalitätsrate bestimmt. Diese Arbeiten gehen auf ein Protokoll von Miller (1992) zurück.

2.2.9.3 Kombination von UV- mit NTG-Mutagenisierung

Paenibacillus pabuli M1 wurde in einer 5.0 ml Casein-Sojamehlpeton-Flüssigkultur (2.1.11.2) über Nacht auf dem Schüttler bei 28°C inkubiert. Um die Zelldichte zu ermitteln, erfolgte anschließend eine photometrische Messung bei 546 nm. Die Autoren Carlton und Brown (1981) empfehlen, eine Keimzahl von 2×10^8 Mikroorganismen pro Milliliter nicht zu überschreiten.

Um die Zellteilung zu stoppen, wurden die Zellen weiterhin in sterile 15 ml-Falcon Tubes überführt und für 10 Minuten im Eisbad inkubiert. Der Ansatz wurde bei 5000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet anschließend in 1 ml einer 0.1 M MgSO_4 -Lösung aufgenommen. Des weiteren wurde die Zellsuspension in eine sterile Plastik-Petrischale gegossen und 4 Minuten unter stetem Schwenken der UV-Quelle ausgesetzt. Um die Photoreaktivierung zu verhindern, erfolgten alle weiteren Arbeiten unter Vermeidung einer direkten Lichteinstrahlung. Zur Entfernung der 0.1 M MgSO_4 -Lösung wurden die Zellen in sterile Eppendorf-Cups überführt und für 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 2.5 ml Saline aufgenommen. Von dieser Suspension wurden 250 µl entnommen und damit ein 5 ml Casein-Sojapepton-Flüssigröhrchen beimpft (2.1.11.2). Das Kultivierungsgefäß wurde mit Aluminiumfolie umwickelt, um Lichteinfall während der Inkubation zu vermeiden.

Nach Inkubation der Zellen über Nacht bei einer Temperatur von 28°C auf dem Schüttler erfolgte zunächst eine photometrische Messung bei 546 nm zur erneuten Bestimmung der Zelldichte. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten auf Eis inkubiert, um sie dann für 5 Minuten bei 5000 rpm zu zentrifugieren und weiterhin in 2.9 ml Citrat-Puffer (2.1.12) zu resuspendieren. Entsprechend einer Endkonzentration von 500 µg/ml im Ansatz wurde eine NTG-Stocklösung hinzugefügt. Die Inkubation in Gegenwart von NTG erfolgte über einen Zeitraum von 55 Minuten bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert und in 2.0 ml Phosphat-Puffer aufgenommen. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt. Von dieser Suspension wurden 250 µl entnommen und damit ein 5 ml Casein-Sojapepton-Flüssigröhrchen beimpft. Es schloß sich eine weitere Outgrowth-Periode bei 28°C auf dem Schüttler für einen Tag an.

Des weiteren erfolgte erneut eine Keimzahlbestimmung im Photometer bei 546 nm. Anschließend wurden die Organismen in steriler Saline verdünnt, um sie auf der Agaroberfläche so zu vereinzeln, daß die Ausbildung von unterschiedlich großen und klaren Höfen um die Kolonien herum zu beobachten war. Es erfolgte eine Inkubation bei 28°C über mehrere Tage auf Tributyrin Agar-Platten (2.1.11.3).

2.2.9.4 Zugabe von Kupfer(II)Chlorid-Ionen während der UV-Mutagenisierung

Entsprechend den Angaben von Rossmann (1989) wurden während der Bestrahlung mit UV-Licht Kupfer(II)Ionen hinzugefügt. Der Autor empfiehlt Konzentrationen von 50 µmol. Da es sich hierbei um Arbeiten an humanen Zelllinien handelte, wurde in den vorliegenden Untersuchungen die Konzentration an Cu(II)Ionen sukzessive um die zehnfache Menge erhöht. Es wurden 42 mg Cu(II)Cl₂ in 50 ml demineralisiertem Wasser gelöst und sterilfiltriert. Anschließend wurde dieser Ansatz mit dem Mutagenisierungsansatz um einen Faktor von 10 verdünnt. Daraus ergab sich eine Endkonzentration von 500 µmol.

2.2.10 Makrorestriktions-Analyse

2.2.10.1 Kultivierung der Organismen

Zunächst wurde eine Vorkultur von *Paenibacillus pabuli* M1 auf festem Casein-Sojamehlpepton-Agar hergestellt (2.1.11.2) und bei 28°C über Nacht inkubiert. Eine Suspension dieser Zellen in Saline diente als Inokulum für eine 10 ml Casein-Sojamehlpepton-Flüssigkultur (2.1.11.2). Diese wurde über einen Zeitraum von 2 Tagen auf

dem Schüttler bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und bei 5000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Diese Probe wurde anschließend auf Eis gelagert.

2.2.10.2 DNA-Präparation: Anfertigen der Agarose-Plugs

Die DNA-Präparation wurde nach Gothues *et al.* (1990) durchgeführt. Die Besonderheit dieser Methode besteht darin, die Organismen in eine Matrix aus Agarose, die sogenannten Plugs, einzubetten. Dazu wurden die durch Zentrifugation gewonnenen Pellets mit Saline EDTA-Puffer um einen Faktor von 100 verdünnt und anschließend durch Messung der optischen Dichte im Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm auf Werte von 2, 6 und 8 eingestellt (2.1.13). Das Gesamtvolumen der Proben entsprach 500 µl. Die notwendige Menge geschmolzener 2%iger Agarose in SE-Puffer wurde hinzugefügt. Aus diesem Mix wurden anschließend die Plugs in entsprechenden Vorrichtungen gegossen.

2.2.10.3 Verdau mit Lysozym

Nach dem Gelieren der Agarose durch Inkubation der Proben für mindestens 15 Minuten bei 4°C im Kühlschrank wurden die Plugs gevierteilt und in sterile 15 ml Falcon-Tubes überführt. Es wurden 10 ml einer Lysozym-Lösung hinzugefügt, die einer Konzentration von 1.0 mg/ml Saline EDTA entsprach. Die Proben wurden anschließend über Nacht bei einer Temperatur von 37°C im Wasserbad inkubiert.

2.2.10.4 Verdau mit Proteinase K

Nachdem die Lysozym-Lösung abgezogen worden war, wurden den Plugs entsprechend einer Endkonzentration von 0.5 mg/ml jeweils 5 ml einer Proteinase K-Lösung hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei einer Temperatur von 50°C im Wasserbad inkubiert.

Nach Abschluß dieses Verdaus wurde die Enzymlösung entfernt und der gesamte Ansatz mit TE-Puffer bedeckt. In diesem Zustand wurden die Röhrchen über Nacht bei 4°C inkubiert und am folgenden Tag der Puffer mehrfach ausgetauscht. Die Plugs waren so über einen Zeitraum von mindestens 6 Monaten bei 4°C im Kühlschrank lagerbar.

2.2.10.5 Verdau mit selten-schneidenden Restriktions-Endonukleasen

Die zu verdauenden Inserts wurden zur Äquilibrierung dreimal im Abstand von mindestens 30 Minuten mit dem entsprechenden Reaktionspuffer der zu verwendenden Restriktions-Endonuklease (RE) versehen. Für jede RE sollten jedoch die Anweisungen des Herstellers bezüglich der Zugabe von DTT und BSA sowie die Konzentrationsangaben der Enzyme und ihre Reaktionstemperatur beachtet werden.

In der Regel werden jeweils 2 Plugs mit 150 µl Reaktionspuffer versehen. Diesem Ansatz wurden sowohl 1 µl DTT (1M), 1 µl BSA (20 mg/ml) und 10 U der entsprechenden RE zugesetzt. Die Lösung wurde gut gemischt und anschließend bei der entsprechenden Temperatur im Wasserbad über Nacht inkubiert. Die Reaktion wurde am folgenden Tag durch die Abnahme des Reaktionsgemisches und Zugabe von TE-Puffer gestoppt. Noch am selben Tag wurde dieser Vorgang mehrmals wiederholt. Die so behandelten Inserts waren bei 4°C im Kühlschrank über einen längeren Zeitraum lagerbar.

2.2.10.6 Auftrennung der DNA-Fragmente

Die in Agarose eingebetteten DNA-Fragmente wurden in einem anschließenden Verfahren elektrophoretisch aufgetrennt. Das verwendete CHEFTM-DR II System wurde dazu mit ca. 1.6 Liter 0.5 TBE-Puffer versehen. Dem System wurden ca. 30 Minuten vor Beginn des Laufes der Puffer hinzugefügt und die Temperatur auf 14°C eingestellt.

Zur Anfertigung eines 1%igen Agarose-Gels wurde ein Gießstand der Maße 15 x 15 cm benutzt. Um eine exakte Agarose-Konzentration (1g Agarose in 100 ml 0.5 TBE-Puffer) zu gewährleisten, wurde nach Aufkochen der Wasserverlust im Ansatz korrigiert. Das Gel wurde anschließend mit den vorher angefertigten Agarose-Plugs beladen und mit flüssiger Agarose verschlossen. Außerdem wurde ebenfalls mindestens ein DNA-Größenstandard aufgetragen. Die Laufparameter wurden für *Paenibacillus pabuli* M1 zunächst empirisch ermittelt. Für ein *SwaI* verdautes Genom hatten sich dabei die folgenden Parameter als besonders geeignet gezeigt:

Pulszeiten:	1-25 Sekunden bei einer Laufzeit von 15 Stunden 0.5-10 Sekunden bei einer Laufzeit von 12 Stunden
weitere Parameter:	14°C, 6 V/cm, 1%iges Agarose-Gel, 0.5 TBE-Puffer, innerer Winkel 180°

Nach Beendigung des Elektrophorese-Laufes wurde das Gel entnommen und mit 10 µl Sybr

Green in 100 ml 0.5 TBE-Puffer 1 Stunde auf dem Schüttler gefärbt. Anschließend erfolgte die Geldokumentation mit einer Polaroid MP 4 Apparatur und einer Instant Camera unter Verwendung eines Rotlichtfilters durch Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 312 nm.

2.2.11 Anfertigung einer Genbibliothek

2.2.11.1 Kultivierung der Organismen und DNA-Präparation

Paenibacillus pabuli M1 wurde in 50 ml Casein-Sojamehlpepton-Bouillon (2.1.11.2) über einen Zeitraum von 48 Stunden auf einem Schüttler bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Kultur in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 15 Minuten bei 15.000 rpm zentrifugiert. Die Aufarbeitung der DNA wurde unter Verwendung des QIAGEN® Genomic DNA Buffer Sets und der Genomic-Tips, 100/G, durchgeführt und folgte in allen wesentlichen Punkten den Angaben des Herstellers (QIAGEN, Genomic DNA Handbook). Die Konzentration der präparierten DNA wurde anschließend im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und erreichte im Mittel Werte zwischen 0.25 bis 0.3 µg/µl.

2.2.11.2 Partialverdau genomischer DNA mit *EcoRI* und *Sau3A*

Von der zuvor präparierten DNA von *Paenibacillus pabuli* M1 wurden für jeden Ansatz des Verdaus jeweils 3.0 µg DNA verwendet. Dabei wurde nach folgendem Schema verfahren:

Puffer (10fach konzentriert)	10 µl
Enzym (2, 1, 0.5, 0.25 U)	x µl
BSA (20 mg/ml)	1 µl
DTT (1M)	1 µl
DNA	3 µg
ddH ₂ O	x µl

Das Volumen des Gesamtansatzes entsprach 100 µl und die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 1 Stunde im Wasserbad bei 37°C. Anschließend wurde eine Ethanol-Fällung der verdauten DNA (Sambrook und Russel, 2001) durchgeführt. Die Endkonzentration der erhaltenen DNA-Fragmente betrug 0.1 µg DNA/µl TE-Puffer.

2.2.11.3 Verdau des pBluescript® II SK (+) Phagemid-Vektors

Für den Verdau des Vektors wurden insgesamt 10 µg DNA eingesetzt. Dabei entsprach die Ausgangskonzentration des verwendeten Vektors 1 µg/µl. Aufgrund der besonderen Konformation, in der Plasmide vorliegen (supercoiled), wird im Gegensatz zum Verdau genomischer DNA empfohlen, die dreifache Menge Restriktions-Endonuklease zu verwenden. Der pBluescript® II SK (+) Phagemid-Vektor zeichnet sich dadurch aus, daß er die Aufnahme von Inserts bis zu einer Größe von 15 kb erlaubt.

Puffer (10fach konzentriert)	10 µl
<i>Eco</i> RI	30 U
BSA (20 mg/ml)	1 µl
DTT (1M)	1 µl
DNA	10 µg
ddH ₂ O	76.5 µl

Anschließend wurde eine Ethanol-Fällung (Sambrook und Russel, 2001) angeschlossen und der geschnittene Vektor in 110 µl Tris HCl-Puffer aufgenommen. Damit wurde eine Endkonzentration von 0.1 µg/µl eingestellt.

2.2.11.4 Dephosphorylierung der Plasmid-DNA

Durch den Verdau mit *Eco*RI entstehen Fragmente mit 5'-Überhängen, die endständige Phosphat-Gruppen aufweisen. Um eine relativ große Ausbeute an Ligationsprodukten zwischen linearisierter Plasmid-DNA und den zuvor hergestellten Fragmenten der genomischen DNA zu erzielen, empfiehlt es sich, die linearisierten Plasmid-Moleküle unter Verwendung von alkalischer Phosphatase (2.1.8, CIP: Calf Intestinale Phosphatase) zu dephosphorylieren. Im Verhältnis zu der eingesetzten Menge an Plasmid-DNA und damit einer definierten Anzahl phosphorylierter 5'-Überhänge wird eine bestimmte Menge des benutzten Enzyms zugesetzt. 1 µg DNA mit einer Länge von 1000 bp weist 3 pMol Enden auf. PROMEGA empfiehlt pro pMol DNA-Enden eine Menge von 0.01 Unit Phosphatase zu verwenden.

90 µl der zuvor geschnittenen Plasmid-DNA wurden entsprechend der angeführten Rechnung mit 1 Unit CIP versetzt und bei einer Temperatur von 37°C für 30 Minuten im Wasserbad inkubiert. Dann erfolgte eine weitere Zugabe von 1 Unit Enzym und Inkubation bei 37°C für weitere 30 Minuten. Die enzymatische Reaktion wurde durch Einstellen einer Endkonzentration von 5mM EDTA im Ansatz und Erhitzen auf 65°C für 20 Minuten inaktiviert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Ethanol-Fällung von den

Komponenten der enzymatischen Behandlung gereinigt und durch Aufnahme in 100 µl TE-Puffer eine Endkonzentration von 0.1 µg Plasmid/µl eingestellt.

2.2.11.5 Ligation

Ligations-Mix:

Vektor (0.1 µg/µl)	1 µl
Insert (0.1 µg/µl)	1 µl
Ligase-Puffer (10x)	1 µl
rATP (10mM)	1 µl
T4 DNA Ligase (4 U/µl)	0.5 µl
ddH ₂ O	5.5 µl

Parallel zu diesem Ansatz wurden drei Kontrollen durchgeführt, sie bestanden aus:

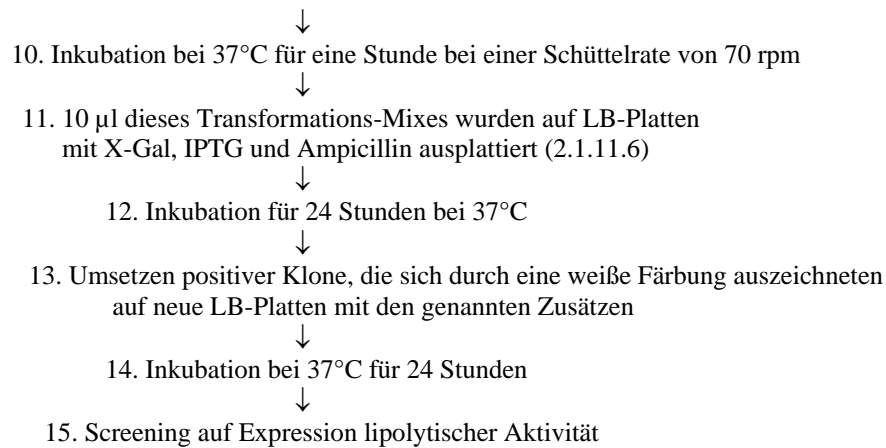
1. Ligations-Mix ohne Insert-DNA
2. Vektor ohne Insert-DNA und Ligase
3. Vektor und Ligase ohne Zugabe von Insert-DNA

Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur (22°C) über einen Zeitraum von 3 Stunden.

2.2.11.6 Transformation

Zur Durchführung der Transformation wurden ultrakompetente Zellen des Herstellers STRATAGENE benutzt (XL 10-Gold®). Sie erlauben die Aufnahme von Konstrukten bis zu einer Größe von 25 kb und zeichnen sich durch das Vorhandensein des *lacI^r ZAM15* Gens auf dem F' Episoms aus, das unter Verwendung entsprechender rekombinanter Plasmide das Blue-White Color Screening unterstützt. Die Transformation der ultrakompetenten Zellen wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. XL Gold Zellen, 50 µl, im Eisbad auftauen
- ↓
2. Zugabe von 2 µl Mercapto-Ethanol
- ↓
3. Inkubation auf Eis für 10 Minuten
- ↓
4. Schütteln des Ansatzes alle 2 Minuten
- ↓
5. Zugabe von 0.5 µl des Ligations-Ansatzes
- ↓
6. Inkubation auf Eis für weitere 30 Minuten
- ↓
7. Hitze-Schock bei exakt 42°C für 30 Sekunden
- ↓
8. Inkubation auf Eis für 2 Minuten
- ↓
9. Zugabe von 450 µl auf 37°C vorgewärmtes NZY⁺-Medium (2.1.11.6)



2.2.12 Screening auf Expression lipolytischer Aktivität

Der Nachweis dieses Merkmals erfolgte auf Tributyrin Agar-Platten (2.1.11.3). Tributyrin wurde dem Medium zum Nachweis lipolytischer Aktivität hinzugefügt. Außerdem wurde eine Ampicillin-Endkonzentration von 100 µg/ml eingestellt. Zur Kontrolle wurden transformierte Zellen eingesetzt, die ein Plasmid ohne Insert aufgenommen hatten. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von maximal 3 Tagen bei einer Temperatur von 37°C.

Nach einem Screening von annähernd 10.000 Klonen fanden sich 8, die eine positive Tributyrin-Reaktion aufwiesen. Zum Nachweis, daß sich das gesuchte Merkmal stabil etabliert hatte, wurden diese Klone erneut auf Tributyrin Agar-Platten mit Ampicillin umgesetzt. Nach wiederholter Beobachtung einer positiven Reaktion wurden Glycerin-Kulturen (2.2.1.2) angefertigt. Auch diese wurden mit Ampicillin einer Endkonzentration von 100 µg/ml versehen.

2.2.13 Sequenzierung

2.2.13.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Präparation wurde in modifizierter Form nach Birnboim und Doily (1979) durchgeführt. Sie ermöglicht die Präparation kleiner zirkulärer Plasmide bis zu einer Größe von 40 kb. Die Methode beruht darauf, daß nach alkalischer Lysis und anschließender Neutralisation die denaturierte DNA kleinerer Plasmide wieder in den ursprünglichen Konformationszustand zurückkehren, während größere Plasmide und die chromosomale DNA im denaturierten Zustand verbleiben und durch Zentrifugation abgetrennt werden können.

In den benutzten Reaktionsgefäßen wurden zunächst 50 µl EDTA-Lösung (50 mM EDTA, 20% [w/v] Succrose in 50 mM Tris HCl, pH 7.5) vorgelegt und eine Impföse Zellmasse

suspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl Lysis-Lösung (1% SDS [w/v] in 0.2 M NaOH) und eine Inkubation bei 70°C für 5 Minuten. Danach wurde die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt und 1.5 µl einer 4 M KCl zugefügt. Es wurde noch einmal für 5 Minuten im Eisbad inkubiert und daraufhin bei 14.000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in den folgenden Arbeitsschritten durch eine Ethanol-Fällung gereinigt.

2.2.13.2 Amplifikation der klonierten Inserts

2.2.13.3 Plasmid-Präparation

Eine sehr einfache Präparation für Plasmid-DNA besteht darin, die Zellen aufzukochen. Dazu wird eine Impföse Zellmasse in 100 µl Wasser suspendiert und anschließend für 10 Minuten bei 98°C erhitzt. Dann wird für weitere 10 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert und der erhaltene Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Plasmid-DNA kann in dieser Form bei -18°C gelagert werden.

2.2.13.4 M13-PCR

Ein Reaktionsvolumen von 50 µl während der PCR setzte sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen:

PCR-Puffer (10x)	5 µl
dNTPs (2.1.7)	10 µl
M13-R Primer (Tab.1)	0.5 µl
M13-F Primer (Tab.1)	0.5 µl
DNA	5 µl
ddH ₂ O	28.6 µl
Taq Polymerase (2.1.7)	0.2 µl

Die M13-PCR erfolgte nach den Bedingungen eines sogenannten *Cold Starts*, d.h. die Taq-Polymerase wurde vor dem ersten Denaturierungsschritt in das Reaktionsgefäß pipettiert. Die beiden Primer wurden in einer Konzentration von 0.5 µg/µl eingesetzt. Es wurden dabei folgende Bedingungen eingehalten:

Stufe 1	94°C für 4 Minuten
Stufe 2	52°C für 1 Minute
(27x)	72°C für 3 Minuten
	93°C für 1 Minute
Stufe 3	72°C für 5 Minuten

Es ist möglich, PCR-Produkte einer Größe zwischen 0.2 bis 20 kb unter Verwendung einer DNA-Bindungsmatrix aufzureinigen. Dazu wurde das Prep-A-Gene® DNA-Purification Kit des Herstellers Bio-Rad benutzt (2.1.7).

2.2.13.5 Primer Walking

Die M13-PCR führte zu einer Amplifikation von DNA-Bereichen, die sich aus Plasmid-DNA (zwischen der *EcoRI*-Schnittstelle und der Bindungsstelle für den M13-Primer) sowie der DNA des Inserts zusammensetzte. Mit Hilfe der Dideoxynucleotid-Sequenzierreaktion und unter Verwendung eines M13-Primers wurden die ersten 250 bis 350 Nukleotide der eingefügten DNA bestimmt. Anhand dieser Sequenzanalyse wurde ein weiterer Primer entwickelt, der so gewählt worden ist, daß er sich ungefähr 300 Nukleotide upstream von der Bindungsstelle des ersten, des M13-Primers, befindet. Dieses sogenannte *Primer* oder auch *Chromosome Walking* wurde so lange fortgeführt bis das vorliegende Insert komplett sequenziert und das gegenüberliegende Ende des verwendeten Plasmides erreicht worden ist (Tab 1: M13-F, F27-455, F27-700, F27-1000). Mit dem komplementären Strang wurde ebenfalls in dieser Weise verfahren (Tab. 1: M13-R, R27-150, R27-450, R27-820, R27-1250).

2.2.13.6 Sequenzierung

Die Ermittlung der Nukleotidsequenz erfolgte nach dem Prinzip des *enzymatischen Kettenabbruchs*, der *Didesoxynukleotidmethode* nach Sanger *et al.* (1977). Sie beruht auf dem Prinzip, daß die DNA von einem festgelegten Ausgangspunkt, der Primerbindungsstelle, neu synthetisiert und dieser Vorgang nukleotidspezifisch abgebrochen wird. Dadurch entsteht eine bestimmte Population an DNA-Molekülen, die anschließend gelelektrophoretisch ihrer Größe entsprechend in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden.

2.2.13.7 Cycle Sequencing-PCR

Die PCR-Reaktion für das Cycle Sequencing wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Die Konzentration der verwendeten Primer betrug 0.025 µg/µl und der Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Termination Mix (2.1.7)	8 µl
ddH ₂ O	10 µl
Primer (Tab. 1)	1 µl
PCR-Produkt	1 µl

Cycle Sequencing-Programm:

1. Denaturierung 96°C für 10 Sekunden
 2. Annealing 50°C für 5 Sekunden
 3. Elongation 60°C für 4 Minuten
- Die Zyklen 1. bis 3. wurden 25fach wiederholt.

Die Sequenzier-Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl Natriumacetat und 50 µl eiskaltem 96%igem Ethanol, absolut, auf Eis gefällt und anschließend bei 14.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Die präzipitierten Produkte wurden mit 250 µl kaltem 70%igem Ethanol, absolut, gewaschen und erneut mit 14.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die präzipitierten DNA-Fragmente getrocknet und in 2.5 µl Formamid (deionisiert) und 0.5 µl 5 mM EDTA-Lösung aufgenommen. Es wurde bei 94°C für 2 Minuten denaturiert, kurz zentrifugiert und daraufhin konnten die Proben auf das Sequenziergel aufgetragen werden.

2.2.13.8 Herstellung eines Polyacrylamid-Gels

Die Detektion der farbstoffmarkierten Fragmente erfolgte mit einem Laser. Aus diesem Grund war es notwendig, ein blasenfreies Gel herzustellen und die Glasplatten schlieren- und fusselfrei zu halten. Die verwendeten Glasplatten wurden vor jedem Lauf mit einem hochwirksamen Detergenz (z.B. Alkanox) gespült und anschließend mit Isopropanol gereinigt. 30 g Harnstoff, 9 ml 40%iges Acrylamid/Bisacrylamid, 6 ml 10xTBE-Puffer (2.1.12) und 22.5 ml destilliertes Wasser wurden bei einer Temperatur von 50 ml gemischt, anschließend durch Verwendung einer Wasserstrahlpumpe und Anlegen eines Unterdruckes filtriert und gleichzeitig entgast. Die Polymerisation des Gels wurde durch Zugabe von 180 µl 10%igem Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 24 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) gestartet und dauerte ca. 2 Stunden. Der Lauf erfolgte in einem DNA-Sequencer 373 des Herstellers Applied Biosystems, Weiterstadt, bei 1500 V, 30 Watt und 20 mA über einen Zeitraum von 12 Stunden in 1x TBE als Lauf-Puffer (2.1.12) und lieferte die Rohdaten der Sequenzen durch die angeschlossene Software in Form von Chromatogrammen und Textdateien.

2.2.14 Amplifikation des Esterase-Gens

Ein Volumen von 100 µl während der PCR-Reaktion setzte sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen:

PCR-Puffer (10x)	10 µl
dNTPs (2.1.7)	20 µl
PP-est-PCR-F (Tab. 1)	1 µl
PP-est-PCR-R (Tab. 1)	1 µl
DNA	1 µl
ddH ₂ O	66.6 µl
Taq Polymerase (2.1.7)	0.4 µl

Diese PCR erfolgte nach den Bedingungen eines sogenannten *Cold Starts*. Die Primer-Konzentration betrug 0.5 µg/µl, ansonsten wurden folgende Bedingungen eingehalten:

Schritt 1	94°C für 3 Minuten
Schritt 2 (30x)	55°C für 1 Minute 72°C für 3 Minuten 93°C für 1 Minuten
Schritt 3	72°C für 5 Minuten

3. Ergebnisse

3.1 Gaschromatographische Untersuchungen des aeroben Fettsäure-Abbaus bei *Paenibacillus pabuli* M1

Der lipolytische Angriff von Lipasen und Esterasen an Triglyceriden führt zu einer Freisetzung unterschiedlicher Fettsäuren, die sich durch diesen Vorgang in ungebundener Form außerhalb der bakteriellen Zellen oder im periplasmatischen Raum anhäufen. Über die Aufnahme und Verwertung dieser Verbindungen, zumal bei unterschiedlichen Organismen, liegen wenig gesicherte Daten vor.

Durch Inkubation in Flüssigkulturen unterschiedlicher Zusammensetzung und eine daran anschließende gaschromatographische Analyse sollte das Potential von *Paenibacillus pabuli* M1, verschieden lange gesättigte und ungesättigte Fettsäuren aerob zu verwerten, untersucht werden (2.2.8). Bei den dargestellten Werten handelt es sich um einen errechneten Quotienten aus dem internen Standard, der Referenzfettsäure, und der Abbaufettsäure (in Prozent) bezogen auf die gaschromatographisch ermittelten Peakflächen der einzelnen Verbindungen

3.1.1 Abbau freier Stearinsäure

Langkettige Fettsäuren, die ein Grundgerüst von 18 Kohlenstoffatomen aufweisen, repräsentieren die am häufigsten vorkommenden Verbindungen dieser Stoffklasse in pflanzlichen Fetten (Souchi *et al.*, 1986). Aus diesem Grund wurde zunächst der Abbau von freier Stearin- (C18:0), Öl- (C18:1) und Linolsäure (C18:2) durch *Paenibacillus pabuli* M1 gaschromatographisch untersucht. Die Kultivierung der Organismen erfolgte auf Mineralsalzbasis-Medium unter Zugabe der genannten Fettsäuren als einziger Kohlenstoff-Quelle (2.2.8.1). Diese Versuche wurden in vier parallelen Ansätzen, die wiederum jeweils in fünf Parallelen methyliert worden waren, abgesichert. Der Versuchsaufbau war so gewählt worden, daß die Referenzfettsäuren Tridecansäure (C13:0) und Behensäure (C22:0) als ein interner Standard direkt vor der Extraktion der Abbau-Fettsäure hinzugefügt wurden (2.2.8.2.1). Dieser Vorgang diente der Kontrolle der Extraktion, aber auch der Kontrolle der anschließenden gaschromatographischen Detektion der Fettsäuren. Des weiteren wurden zwei zusätzliche Arten von Kontrollansätzen benutzt. Eine Kontrolle wurde während der Inkubation mitgeführt, eine weitere Kontrolle wurde direkt vor der Extraktion hergestellt. Beide wiesen die gleiche Zusammensetzung wie die anderen Ansätze auf, wurden jedoch nicht mit Organismen beimpft. Sie sollten einen Hinweis darauf liefern, ob möglicherweise ein Abbau der Fettsäuren bereits während der Inkubation durch oxidative, chemische Prozesse stattgefunden hatte. Unter den genannten Bedingungen ließ sich kein Nachweis des Abbaus von Stearinsäure durch den

vorliegenden Organismus erbringen. Bei einem Vergleich der vier Abbauansätze schwankte das Verhältnis beider Fettsäuren im Mittel um einen Wert von 0.8. Die beiden Kontrollen, die während der Inkubation mitgeführt wurden, lagen deutlich über diesem Wert, während die Kontrollansätze, die nicht inkubiert wurden, signifikant unterhalb dieses Wertes blieben. Aus diesen Daten ließ sich die klare Tendenz ableiten, daß bereits durch oxidative Prozesse während der Kultivierung, bzw. der zellfreien Inkubation ein Teil der hinzugefügten Stearinsäure abgebaut wurde, eine mikrobielle Verwertung von Stearinsäure aber nicht stattgefunden hatte.

3.1.2 Abbau freier Ölsäure

Die gaschromatographische Analyse des Abbaus von Ölsäure folgte in allen wesentlichen Punkten der vorangegangenen Versuchsdurchführung. Der Organismus wurde zunächst auf Mineralsalzbasis-Medium unter Zusatz von Ölsäure als einziger Kohlenstoff-Quelle über einen Zeitraum von 14 Tagen bei 28°C auf dem Schüttler inkubiert (2.2.8.1). Die Kontrollen, die während der Inkubation mitgeführt wurden, zeigten einen geringeren Anteil an Ölsäure als jene Kontrollen, die nicht inkubiert wurden. Dies mag als ein deutlicher Hinweis darauf zu werten sein, daß die einfach ungesättigte Ölsäure zu einem nicht unerheblichen Teil bereits durch oxidative Prozesse während der Inkubationsphase abgebaut wurde. Zusammenfassend ließ sich unter den genannten Bedingungen der Nachweis eines Abbaus von Ölsäure durch *P. pabuli* M1 nicht erbringen.

3.1.3 Abbau freier Linolsäure

Die gaschromatographisch ermittelten Daten verwiesen ganz eindeutig auf die Tendenz, daß Linolsäure unter den eingehaltenen Bedingungen nicht auf einen mikrobiellen Abbau untersucht werden kann. Die Verbindung ist durch das Vorliegen von zwei Doppelbindungen chemisch derart instabil, daß es zu einer vollständigen Oxidation kommt. Bereits in dem Kontrollansatz, der während der Inkubation mitgeführt wurde und der keine Organismen aufwies, ließen sich nach 14 Tagen Inkubation auf dem Schüttler bei 28°C keine Spuren von Linolsäure gaschromatographisch nachweisen.

3.1.4 Fettsäureabbau in Gegenwart von Glucose

Die Durchführung dieser Arbeiten entsprach den Versuchsbedingungen der vorangegangenen Untersuchungen. Dem Mineralsalzbasis-Medium wurde zusätzlich Glucose in einer

Konzentration von 0.5% hinzugefügt (2.1.11.7 und 2.2.8.1). Außerdem wurde das Spektrum der untersuchten Fettsäuren auf einen Bereich von Buttersäure (C4:0) bis zur Ölsäure (C18:1) erweitert. Die Auftrennung der kurzkettigen Ansätze (C4:0 bis C10:0) machte es notwendig, Propionsäure (C3:0) als internen Standard zu verwenden. Dabei wurden alle Fettsäuren dem Medium als freie Säuren hinzugefügt.

3.1.4.1 Untersuchung des Abbaus kurzkettiger Fettsäuren in Gegenwart von Glucose

Alle vier untersuchten kurzkettigen Fettsäuren (C4:0 bis C10:0) zeigten unter den gegebenen Bedingungen keine signifikante Abnahme. Ein Abbau durch *Paenibacillus pabuli* M1 ließ sich nicht nachweisen. Die beiden eingesetzten Kontrollen erreichten in allen Untersuchungen ein miteinander vergleichbares Verhältnis zwischen Referenz- und Abbaufettsäure (Abb. 4).

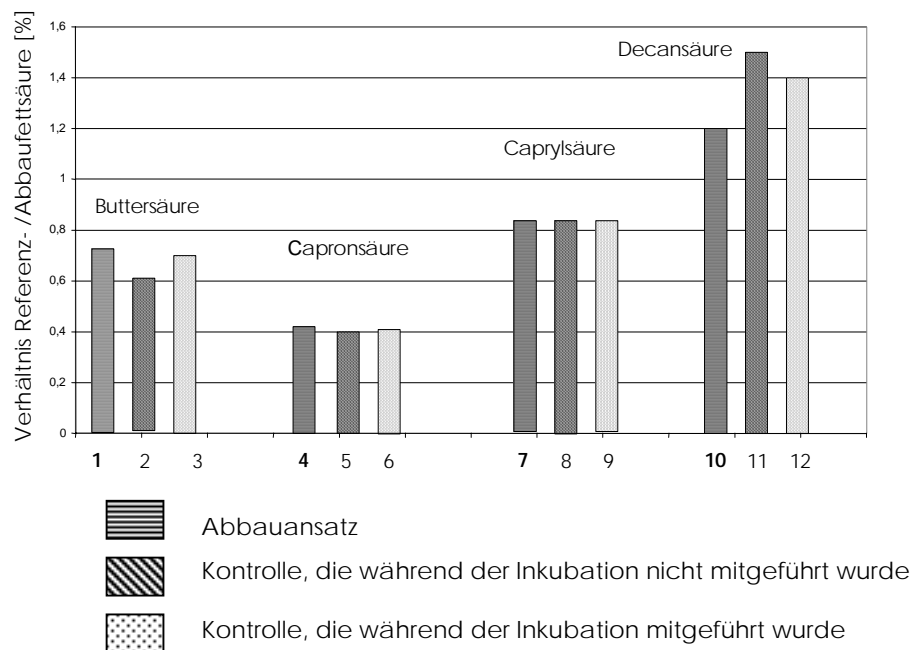


Abb. 4.

Abbau von freier Butter-, Capron-, Capryl- und Decansäure in Gegenwart von Glucose durch *Paenibacillus pabuli* M1.

Der Organismus wurde auf Mineralsalzbasis-Medium über einen Zeitraum von 14 Tagen bei 28°C auf dem Schüttler inkubiert. Die dargestellten Werte wurden durch das Verhältnis Referenz- zu Abbaufettsäure gebildet.

1: C 4:0: Abbauansatz: Buttersäure, **2:** C 4:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **3:** C 4:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde, **4:** C 6:0: Abbauansatz: Capronsäure, **5:** C 6:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **6:** C 6:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde, **7:** C 8:0: Abbauansatz: Caprylsäure, **8:** C 8:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **9:** C 8:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde, **10:** C 10:0: Abbauansatz: Decansäure, **11:** C 10:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **12:** C 10:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde.

3.1.4.2 Untersuchung des Abbaus mittel- bis langkettiger Fettsäuren in Gegenwart von Glucose

Der Aufbau der vorangegangenen Untersuchungen wurde dahingehend modifiziert, daß ausschließlich Tridecansäure (C13:0) als interner Standard und Referenzfettsäure verwendet wurde. Ansonsten blieben die oben angeführten Bedingungen erhalten, d.h. die Kultivierung erfolgte in Gegenwart von 0.5% Glucose und 0.1% Abbau-Fettsäure (C12:0 bis C18:1).

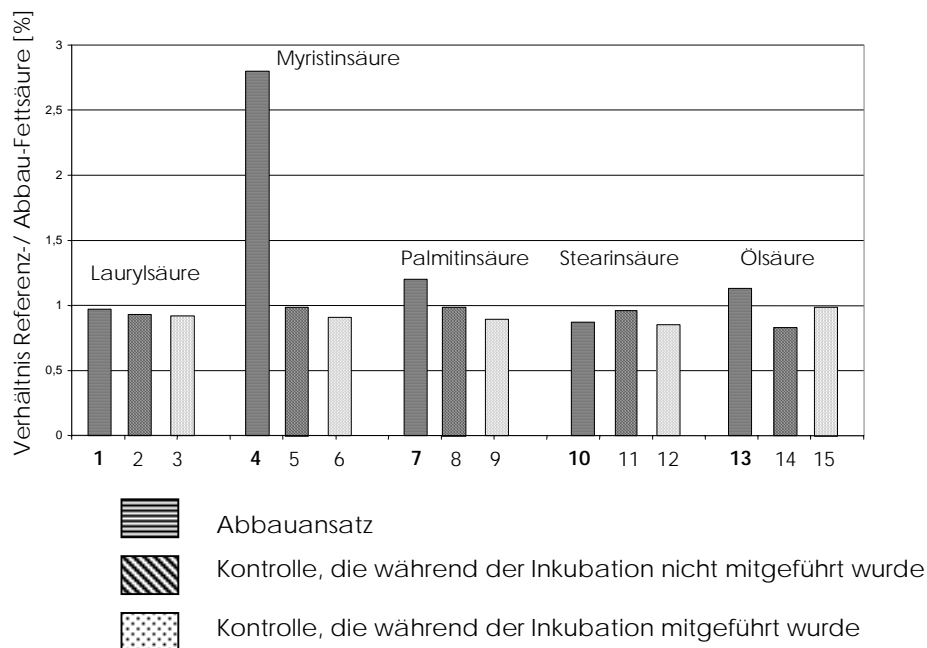


Abb. 5.

Abbau von freier Lauryl-, Myristin-, Palmitin-, Stearin und Ölsäure in Gegenwart von 0.5% Glucose durch *Paenibacillus pabuli* M1.

Der Organismus wurde auf Mineralsalzbasis-Medium über einen Zeitraum von 14 Tagen bei 28°C auf dem Schüttler inkubiert. Die dargestellten Werte wurden durch das Verhältnis Referenz- zu Abbaufettsäure gebildet.

1: C 12:0: Abbauansatz: Laurylsäure, **2:** C 12:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **3:** C 12:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde, **4:** C 14:0: Abbauansatz: Myristinsäure, **5:** C 14:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **6:** C 14:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde, **7:** C 16:0: Abbauansatz: Palmitinsäure, **8:** C 16:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **9:** C 16:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde, **10:** C 18:0: Abbauansatz: Stearinsäure, **11:** C 18:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **12:** C 18:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde, **13:** C 18:1 Abbauansatz: Ölsäure, **14:** C 18:1: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **15:** C 18:1: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde.

Unter den beschriebenen Bedingungen ließ sich ein eindeutiger Abbau von Myristinsäure nachweisen (Abb. 5). Während sich bei allen anderen Ansätzen die Tendenz zeigte, daß das Verhältnis zwischen Referenz- und Abbaufettsäure um einen Wert von 1 schwankte, erreichte

dieses Verhältnis im Myristinsäureansatz eine Größenordnung von 2.8. Der Abbau einer anderen Fettsäure konnte unter den gegebenen Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

3.1.5 Untersuchung des aeroben Abbaus unter Verwendung der Fettsäuren als Natrium-Salze

Die Modifikation dieser Untersuchungsreihe bestand im Vergleich zu den vorhergehenden Versuchen darin, daß die getesteten Fettsäuren als Natrium-Salze zum Medium hinzugefügt worden waren. Sie stellten die einzige Kohlenstoffquelle dar. Auf die Zugabe von Glucose wurde in diesem Ansatz verzichtet.

3.1.5.1 Untersuchung des Abbaus kurzkettiger Fettsäuren als Natrium-Salze

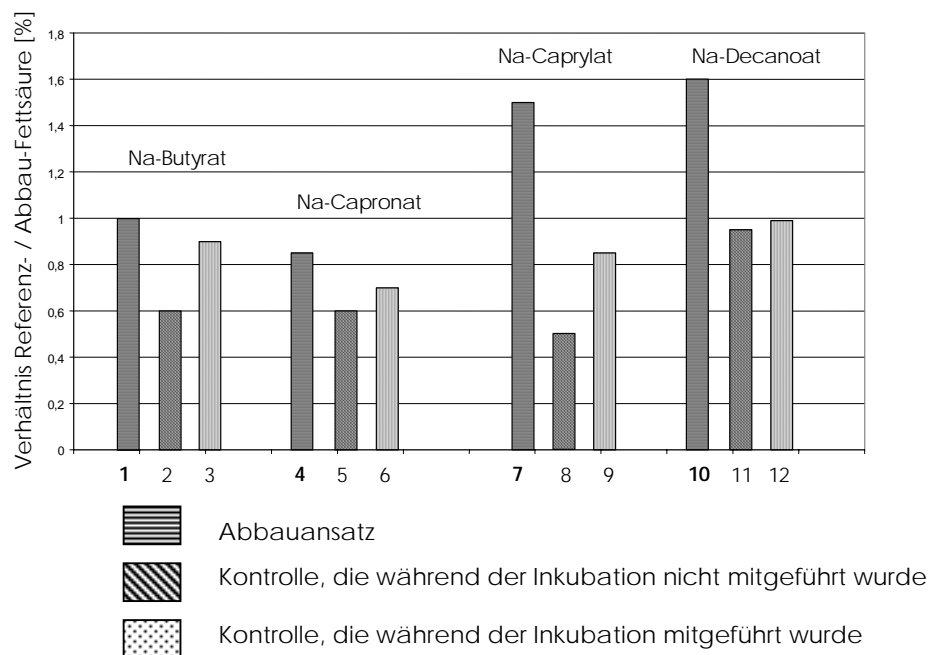


Abb. 6.
Untersuchung des Abbaus von Na-Butyrat, -Capronat, -Caprylat und -Decanoat durch *Paenibacillus pabuli* M1.

Der Organismus wurde in Mineralsalz-Medium über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert, während die untersuchten Fettsäuren in diesem Ansatz als Natrium-Salze eingesetzt wurden. Die dargestellten Werte ergaben sich durch das Verhältnis von Referenz- zu Abbaufettsäure.

1: C 4:0: Abbauansatz Na-Butyrat, **2:** C 4:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **3:** C 4:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde, **4:** C 6:0: Abbauansatz Na-Capronat, **5:** C 6:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde, **6:** C 6:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **7:** C 8:0: Abbauansatz Na-Caprylat, **8:** C 8:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **9:** C 8:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde, **10:** C 10:0: Abbauansatz Na-Decanoat, **11:** C 10:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **12:** C 10:0: Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde.

Ein Abbau von Natrium-Caprylat (C8:0) und Natrium-Decanoat (C10:0) konnte unter den vorliegenden Bedingungen eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 6). Des weiteren zeichnet sich auch ein geringer Abbau von Na-Butyrat und -Capronat ab. In diesen Ansätzen lagen die Werte für das Verhältnis zwischen Referenz- und Abbau-Fettsäure ebenfalls geringfügig über denen der entsprechenden Kontrollen (Abb. 6: C4:0 und C6:0). Diese Ergebnisse fielen aber weniger eindeutig als in den Abbauansätzen von Natrium-Caprylat und -Decanoat aus. Diesem Hinweis folgend, sollte in einem weiteren Ansatz untersucht werden, ob längerkettige Fettsäuren als Natrium-Salze von *Paenibacillus pabuli* M1 ebenfalls verwertet werden.

3.1.5.2 Untersuchung des Abbaus mittel- und langkettiger Fettsäuren als Natrium-Salze

Ein Abbau längerkettigen Fettsäuren (C12:0 bis C18:1), die als Natrium-Salze im Medium vorlagen, konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 7).

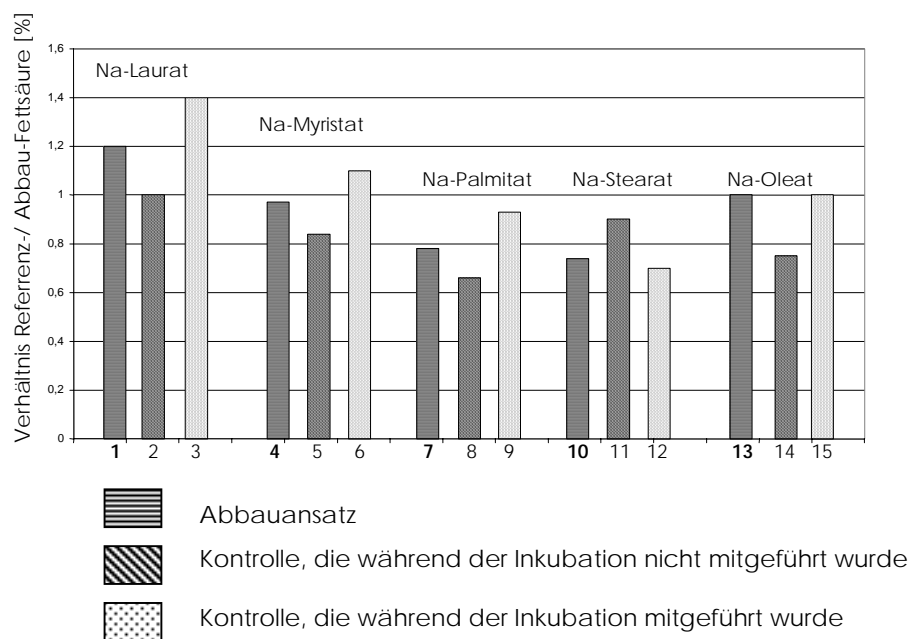


Abb. 7.

Abbau von Na-Laurat, -Myristat, -Palmitat, -Stearat und -Oleat durch *Paenibacillus pabuli* M1.

Der Organismus wurde in einem Mineralsalz-Medium unter Verwendung der einzelnen Fettsäuren als Natriumsalze über einen Zeitraum von 14 Tagen auf dem Schüttler bei 28°C kultiviert. Dabei wurden die dargestellten Werte durch das Verhältnis Referenz- zu Abbaufettsäure gebildet.

1: C 12:0: Abbauansatz Na-Laurat, **2: C 12:0:** Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **3: C 12:0:** Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde, **4: C 14:0:** Abbauansatz Na-Myristat, **5: C 14:0:** Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **6: C 14:0:** Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde, **7: C 16:0:** Abbauansatz Na-Palmitat, **8: C 16:0:** Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **9: C 16:0:** Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde, **10: C 18:0:** Abbauansatz Na-Stearat, **11: C 18:0:** Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **12: C 18:0:** Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde, **13: C 18:1:** Abbauansatz Na-Oleat, **14: C 18:1:** Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase nicht mitgeführt wurde, **15: C 18:1:** Kontrollansatz, der während der Inkubationsphase mitgeführt wurde.

3.1.6 Zugabe von Gum arabicum und Deoxycholsäure als Emulgatoren

In einer abschließenden Untersuchung wurde ermittelt, ob der Abbau von freier Palmitinsäure durch den Zusatz von Deoxycholsäure und Gum arabicum hervorgerufen werden konnte. Diese Substanzen wurden als Emulgatoren (2.1.11.7) für die hydrophobe Palmitinsäureverbindung im Medium eingesetzt.

Es ließ sich zeigen, daß die gaschromatographische Analyse durch den Zusatz beider Substanzen nicht beeinträchtigt wurde. Eine Verwertung der Palmitinsäure konnte allerdings unter diesen Voraussetzungen auch nicht nachgewiesen werden.

3.2 Dünnschicht-chromatographische Untersuchungen an natürlichen Fetten

3.2.1 DC-Auftrennung von Sonnenblumenöl

Die Herstellung von Rhodamin B-Medium (Abb. 21, 22) machte es notwendig, Di- und Monoglyceride sowie freie Fettsäuren aus den dafür verwendeten Fetten (2.1.2.2) zu entfernen (Kouker und Jaeger, 1987). Voraussetzung dafür war, ein Säulen-chromatographisches Verfahren zu etablieren (2.2.3). Die Überprüfung der gereinigten Produkte, die die Säule passiert hatten, erfolgte anschließend auf Dünnschicht-Platten (2.2.4).

Ein handelsübliches Sonnenblumenöl wurde zunächst ohne vorhergehende Behandlung Dünnschicht-chromatographisch aufgetrennt (Abb. 8). Dabei zeigte sich, daß nicht nur Triglyceride sondern auch weitere Bestandteile in dem Fett vorlagen. Diese bestehen in der Regel aus Di- und Monoglyceriden sowie freien Fettsäuren (Kouker und Jaeger, 1987).

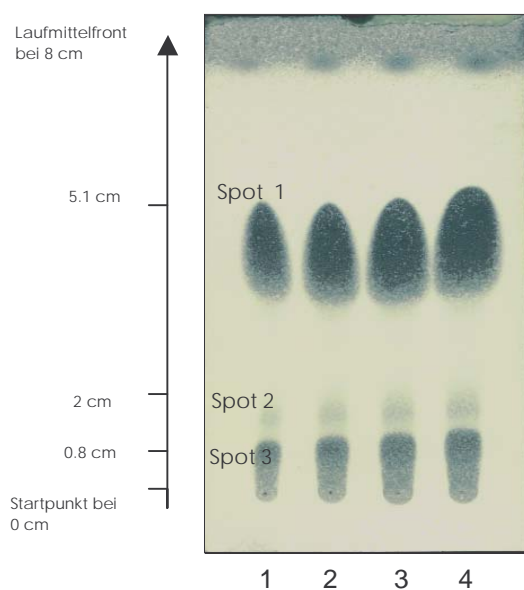


Abb. 8.

Dünnschicht-chromatographische Auftrennung von Sonnenblumenöl.

Die Laufspuren 1-4 wurden mit jeweils 1-4 Tropfen des Fett-Lösungsmittelgemisches versehen. [50 mg Fett in 1 ml tertiärem Butylmethylether (tBME)]. Der Auftrag erfolgte auf Silikagelplatten. Als Fließmittel wurden Hexan und tBME im Verhältnis 9:10 (v/v) eingesetzt. Zum Nachweis wurden 3 ml Sprühreagenz (50 g Dodekamolybdatophosphorsäure in 1 Liter Ethanol) aufgetragen.

3.2.2 DC-Auftrennung von Kokosfett

Kokosfett setzt sich gegenüber Sonnenblumenöl aus Triglyceriden zusammen (2.1.2.2), die andere Fettsäure-Zusammensetzungen aufweisen (Souci *et al.*, 1986). Kokosfett besitzt als Hauptfettsäure-Komponente Laurylsäure (45%), dann folgen Myristinssäure (17.2%) und Palmitinsäure (8.6%). Dagegen besteht die Triglycerid-Komponente von Sonnenblumenöl im wesentlichen aus den längerkettigen, ungesättigten Fettsäuren Linolsäure (60.2%) und Ölsäure (21.9%). Weil nicht notwendigerweise davon ausgegangen werden konnte, daß beide Substanzen eine vergleichbare chemische Stabilität besitzen, wurde das Kokosfett ebenfalls zunächst ohne vorher durchgeführtes Reinigungsverfahren Dünnschicht-chromatographisch aufgetrennt (Abb. 9).

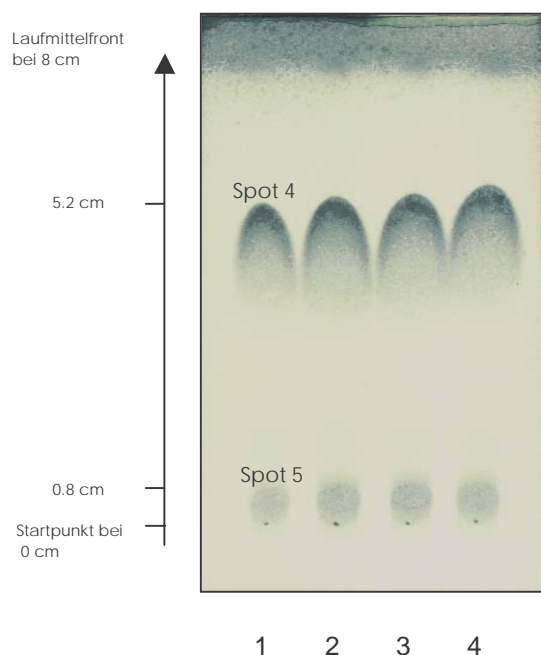


Abb. 9.
Dünnschicht-chromatographische Auftrennung von Kokosfett.
Auftrag: siehe Legende Abb. 8.

Wie bereits die Untersuchungen an Sonnenblumenöl gezeigt hatten, ließen sich auch im Kokosfett Abbauprodukte nachweisen (Abb. 9). Diese bestanden vermutlich aus freien Fettsäuren sowie Di- und Monoglyceriden (Tab. 3). Es erfolgte keine nähere Quantifizierung dieser Substanzen.

3.2.3 DC-Untersuchung von Sonnenblumenöl nach einem Säulen-chromatographischen Reinigungsschritt

Es erfolgte anschließend eine Säulen-chromatographische Aufreinigung des Sonnenblumenöls (2.2.3) durch den Einsatz einer stationären Phase aus Aluminiumoxid. Nachdem die Triglyceride mittels Petroleumbenzin (30-60°C) von der Säule eluiert worden waren, wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer unter Annäherung von Vakuumbedingungen entfernt. Eine im Anschluß daran durchgeführte Dünnschicht-chromatographische Analyse zeigte, daß sich durch das eingesetzte Verfahren sowohl Mono-, als auch Diglyceride sowie freie Fettsäuren entfernen ließen (Abb. 10 und Tab. 3).

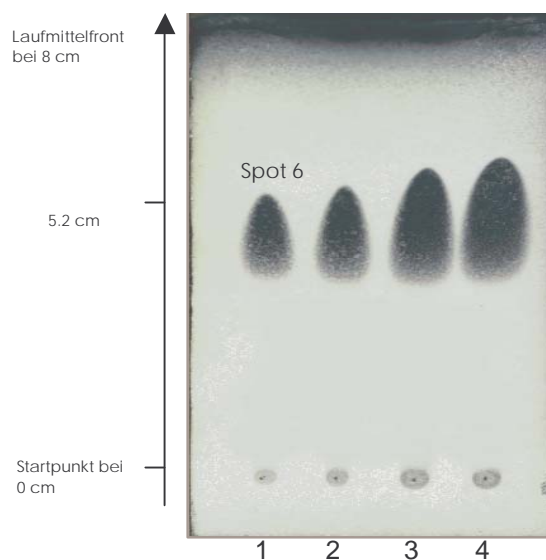


Abb. 10.
Dünnschicht-chromatographische Auftrennung von Sonnenblumenöl nach einem Säulen-chromatographischen Reinigungsschritt.

Auftrag: siehe Legende Abb. 8.

In dieser aufgereinigten, ausschließlich aus Triglyceriden bestehenden, und ohne weitere Begleitprodukte vorliegenden Form war es möglich, das untersuchte Pflanzenöl zur Herstellung von Rhodamin B-Platten zu verwenden.

3.2.4 DC-Untersuchung von Kokosfett nach einem Säulen-chromatographischen Reinigungsschritt

Durch den Einsatz von Aluminiumoxid als stationärer Phase in einer Glassäule konnte auch das vorliegende Kokosfett von allen Begleitprodukten gereinigt werden. Ausschließlich die farblose Triglycerid-Komponente verblieb in dem Fett (Abb. 11).

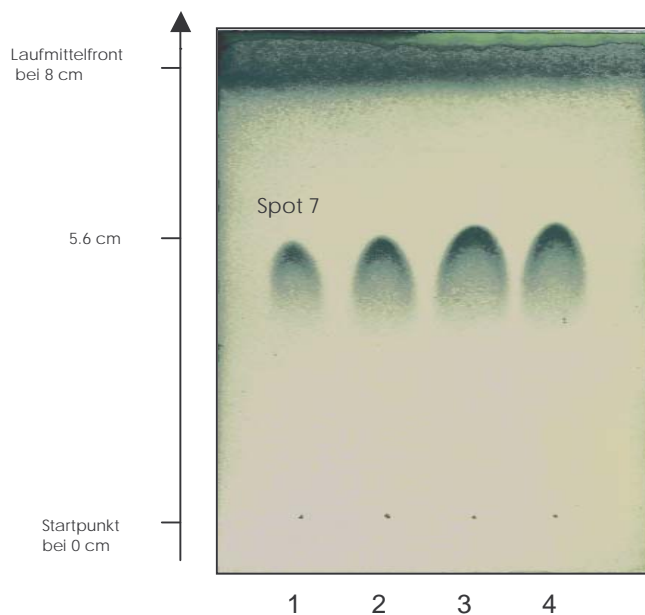


Abb. 11.

Dünnschicht-chromatographische Auftrennung von Kokosfett nach einem Säulen-chromatographischen Reinigungsschritt.

Auftrag: siehe Legende Abb. 8.

Die vorangegangenen Untersuchungen konnten belegen, daß es möglich war, die in unterschiedlichen Fetten vorliegenden Triglyceriden von allen weiteren Bestandteilen zu reinigen (siehe auch 3.2.5.4 und Tab. 3). Nach Durchführung des Säulen-chromatographischen Trennungsvorganges durch Einsatz von Aluminiumoxid als stationärer Phase lagen die gewünschten Triglycerid-Komponenten in reiner Form vor (siehe auch 3.2.5).

3.2.5 DC-Nachweis von Mono-, Di- und Tristearinsäure sowie freier Stearinsäure

Durch den Einsatz eines Standards aus Mono-, Di- und Tristearinsäure sowie freier Stearinsäure unter Einhaltung der gegebenen Laufparameter sollten die folgenden Untersuchungen nachweisen, daß es sich bei der im Fett verbleibenden Substanz tatsächlich um die Triglycerid-Fraktion handelte.

3.2.5.1 DC-Nachweis von Mono- und Diglyceriden

Das Laufverhalten von Monostearinsäure ist dem von Distearinsäure in einem unpolaren Lösungsmittelgemisch ähnlich. Beide Substanzen weisen im Vergleich zur Tristearinsäure deutlich geringere R_F -Werte auf (Tab. 3).

Stellvertretend für alle anderen Diglyceride wurde Distearinsäure aufgetragen. Die untersuchte Substanz bestand zu gleichen Teilen aus 1,3- und 1,2-substituierten Isomeren.

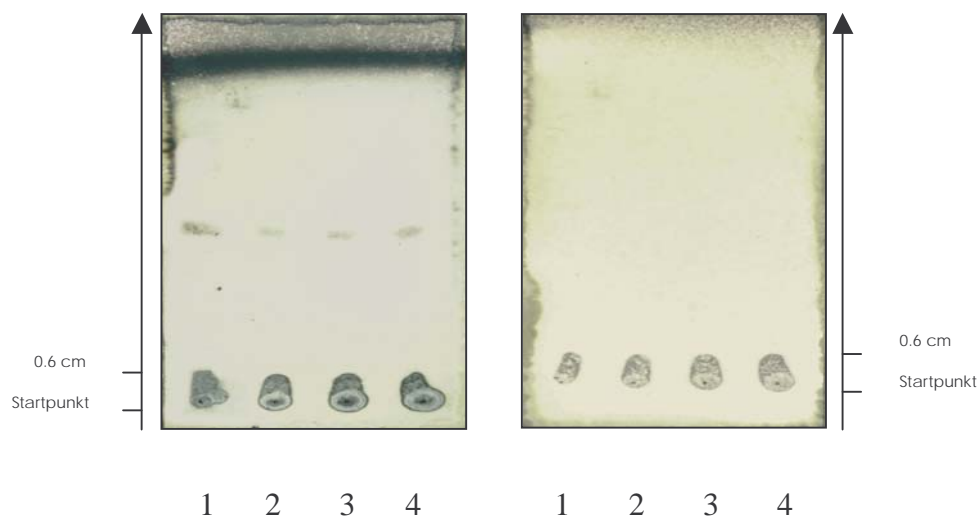


Abb. 12 und 13.

Dünnschicht-chromatographischer Nachweis von 1-Monostearinsäure (Abb. 12) und Distearinsäure.
Auftrag: siehe Legende Abb. 8.

3.2.5.2 DC-Nachweis freier Stearinsäure

Freie Stearinsäure (Abb. 14) zeigte auf Silikagel-Platten unter Verwendung eines Lösungsmittel-Gemisches bestehend aus Hexan und tertButylmethylether ein deutlich von den gereinigten Fetten abweichendes Laufverhalten (Abb. 10, 11 und Tab. 3).

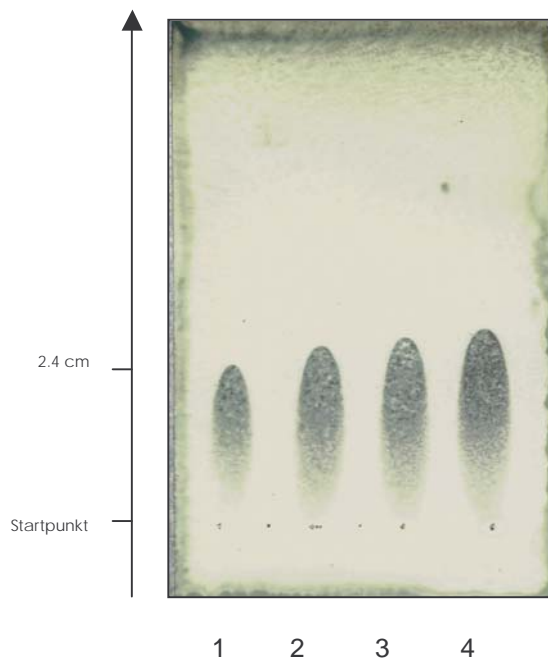


Abb. 14.

Dünnschicht-chromatographischer Nachweis freier Stearinsäure.

Das Laufverhalten von freier Stearinsäure in einem Laufmittel aus Hexan und tertButylmethylether [9:10 (v/v)]. Auftrag: siehe Legende Abb. 8.

3.2.5.3 DC-Nachweis von reinen Triglyceriden

In allen natürlichen Fetten liegen unterschiedliche Gemische von Triglyceriden vor (Souci *et al.*, 1986), die mit verschiedenen Fettsäuren substituiert sind. Stellvertretend für alle Verbindungen wurde Tristearinsäure untersucht. Es ist davon auszugehen, daß die Kettenlängen der Fettsäuren in diesem Zusammenhang für das Laufverhalten weniger ausschlaggebend sind als die Ladungseigenschaften des gesamten Moleküls (Tindall, mündliche Mitteilung). Von allen untersuchten Komponenten zeigte Tristearinsäure ein Laufverhalten,

welches bereits in einem visuellen Vergleich aller Proben mit der gereinigten Fraktion in Kokosfett und Pflanzenöl übereinstimmte (Abb. 10, 11, 15, 16).

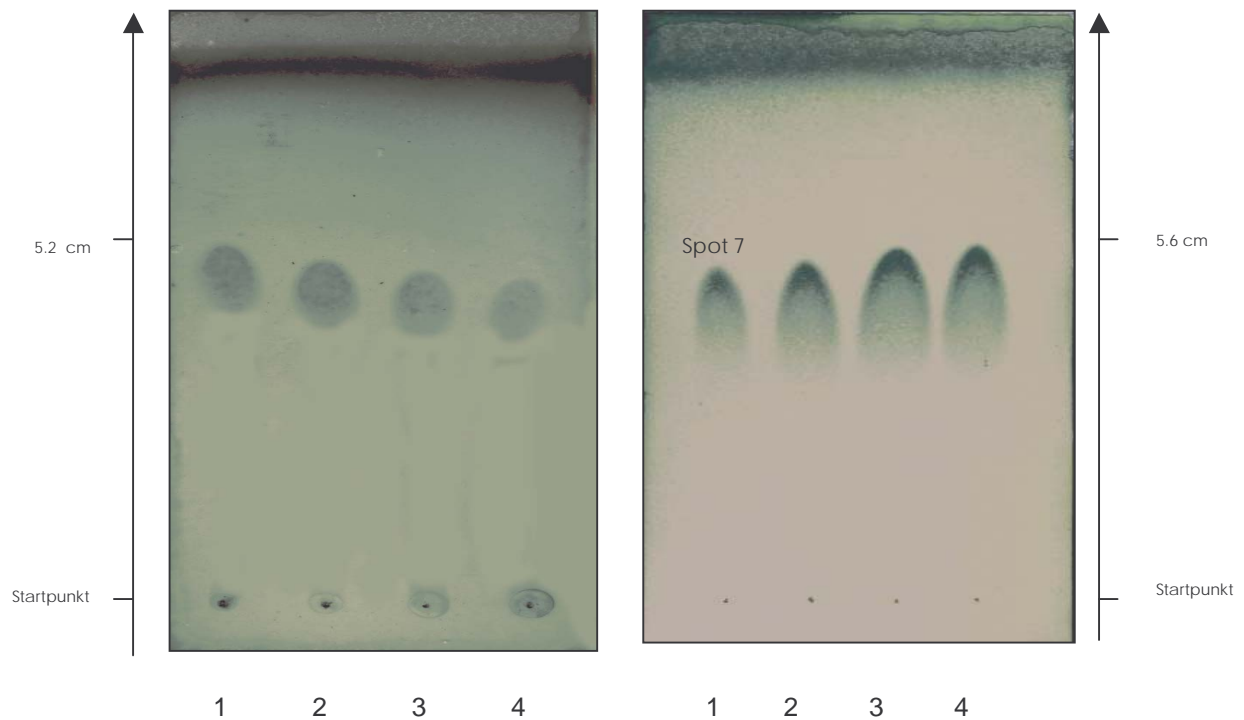


Abb. 15 und 16.

Ein Vergleich der Laufeigenschaften zwischen Tristearinsäure (Abb. 15) und gereinigtem Kokosfett.
Auftrag: siehe Legende Abb. 8.

3.2.5.4 R_f -Werte

Die *Retardation gegenüber der Front* (R_f -Wert) gibt die relative Wanderungsstrecke der zu untersuchenden Substanz wieder und gilt für jede Verbindung in Gegenwart eines bestimmten Lösungsmittels als charakteristisches Merkmal. Zur Überprüfung der bereits visuell festgestellten Übereinstimmung der Laufeigenschaften von Tristearinsäure und gereinigten Fetten wurden die R_f -Werte nach folgender Formel errechnet:

$$R_f\text{-Wert} = \frac{\text{Distanz (Startpunkt-Substanzspot) [cm]}}{\text{Distanz (Startpunkt-Laufmittelfront) [cm]}}$$

Tab. 3. R_f -Werte. Vergleich der untersuchten pflanzlichen Fette (vor und nach einer Säulen-chromatographischen Aufreinigung) mit Referenz-Substanzen.

Referenz-Substanzen	R_f -Werte	getestete Substanzen	R_f -Werte
1. 1-Monostearinsäure	0.075	Spot 1 ¹⁾	0.64
2. Distearinsäure	0.075	Spot 2	0.25
3. Tristearinsäure	0.65	Spot 3	0.1
4. freie Stearinsäure	0.3	Spot 4 ¹⁾	0.65
		Spot 5	0.1
		Spot 6 ¹⁾	0.65
		Spot 7 ¹⁾	0.7

¹⁾ Diese getesteten Substanzen zeigten weitestgehend Übereinstimmung mit Tristearinsäure

Ein Vergleich der ermittelten R_f -Werte zeigt Übereinstimmung zwischen Spot 1 (Abb. 8), Spot 4 (Abb. 9), Spot 6 (Abb. 10), Spot 7 (Abb. 11) mit Tristearinsäure (R_f -0.65). Somit kann davon ausgegangen werden, daß es die Möglichkeit besteht, mit dem angewendeten Säulen-chromatographischen Verfahren die Triglycerid-Komponente von Mono- und Diglyceriden sowie freien Fettsäuren zu trennen. Die natürlichen Fette lassen sich also in dieser Form für die Herstellung von Rhodamin B-Platten aufbereiten. Nach den Angaben von Kouker und Jaeger (1987) ist die Darstellung lipolytischer Aktivität auf diesem Medium nur dann möglich, wenn weder Mono- noch Diglyceride sowie freie Fettsäuren in dem Fett vorliegen.

3.3 Mikrobiologischer Nachweis lipolytischer Aktivität

In der Literatur werden eine Vielzahl von Verfahren zur Darstellung lipolytischer Aktivität auf mikrobiologischen Medien beschrieben. Dazu gehört u.a. der Umsatz von Tween-Verbindungen, Tributyrin Agar-Platten, Rhodamin B-Medium und ein Spirit Blue-Nachweisverfahren.

3.3.1 Tween-Verbindungen

Tweens stellen hydrophile Polyoxyethylenderivate des Sorbitans dar (Abb. 17, 18, 20 und 23). Sie sind mit Fettsäuren einer definierten Kettenlänge durch eine Esterbindung verknüpft (Tab. 4). Werden durch die lipolytische Aktivität der getesteten Organismen die Fettsäuren gespalten, so fallen diese als Calcium-Salze aus und werden als Trübung unter oder um die Kolonie herum sichtbar (2.1.11.3). Dieses Phänomen wird als positive Tween-Reaktion bewertet (Sierra, 1957). Zunächst wurde *P. pabuli* M1 auf Tween 40-Medium inkubiert; dabei zeigte der Organismus eine ausgeprägte lipolytische Reaktion (Abb. 17 und 18).

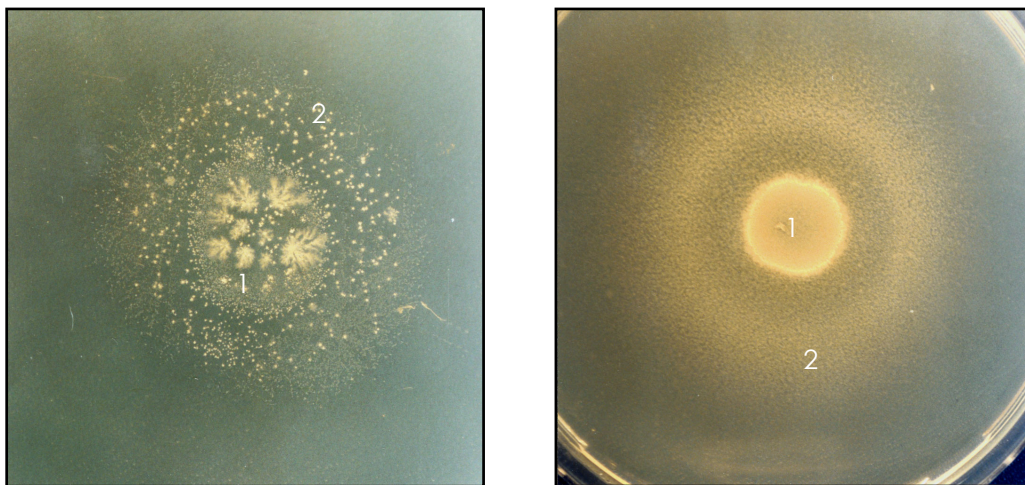


Abb. 17 und 18.

Nachweis lipolytischer Aktivität durch Tween 40 bei *P. pabuli* M1.

Paenibacillus pabuli M1 auf Tween 40-Platten nach 8 Tagen Inkubation bei 28°C. Die kristallinen Strukturen um die Kolonien herum werden durch die Ausfällung von Calcium-Palmitat gebildet (2.1.11.3).

1: Kolonie, 2: Ca-Palmitat-Kristalle.

3.3.2 Spirit Blue-Medium

Neben dem Einsatz von Tween-Verbindungen (Abb. 17, 18, 20 und 23) zum Nachweis lipolytischer Aktivität bietet der Hersteller Difco Spirit Blue-Medium an (Abb. 19), das als Enzymsubstrat Tributyrin enthält. *Staphylococcus aureus*, DSM 20714^T wurde sowohl auf Tween 20-Medium als auch auf Spirit Blue-Medium kultiviert und zeigte dabei unterschiedlich stark ausgeprägte lipolytische Reaktionen (Abb. 19 und 20). Während in Gegenwart von Tween 20 eine sehr deutliche Reaktion auftrat, war sie auf erstgenanntem Medium kaum zu erkennen.

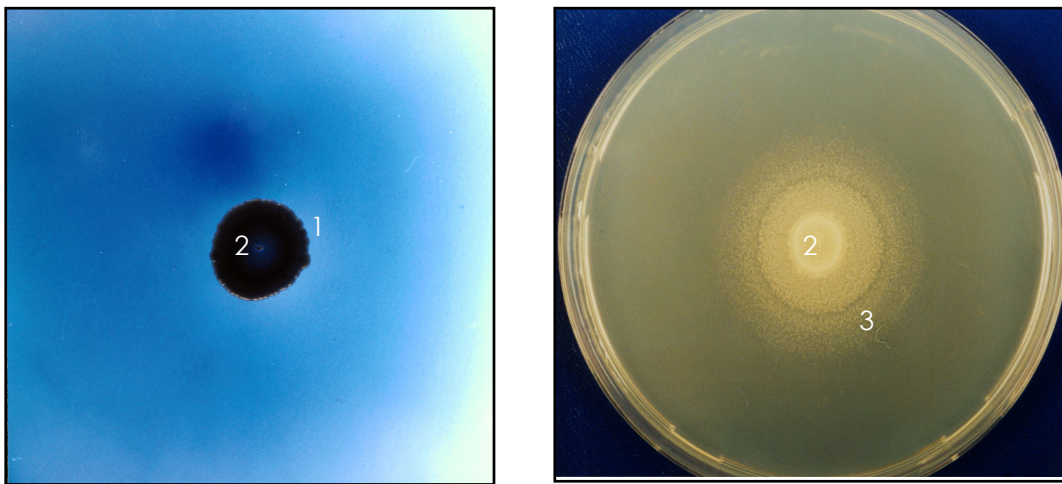


Abb. 19 und 20.

Vergleich von Spirit Blue-Agar und Tween 20-Medium.

Staphylococcus aureus wurde auf Spirit Blue-Agar (linke Abbildung) bei 28°C über einen Zeitraum von 8 Tagen inkubiert (2.1.11.3). Die rechte Abbildung zeigt *Staphylococcus aureus* bei gleicher Temperatur und Kultivierungsdauer auf Tween 20-Medium.

1: klare Zone, 2: Kolonie, 3: Ca-Laurat-Kristalle.

3.3.3 Rhodamin B-Medium

Ein weiteres Verfahren zur Darstellung lipolytischer Aktivität bieten Rhodamin B-Platten. Wesentlich für die Effektivität dieses Verfahrens ist die Tatsache, daß die hinzugefügte Lipid-Komponente frei ist von ungebundenen Fettsäuren (siehe Kap. 3.2). Laut Kouker und Jaeger (1987) ist diese Methode unabhängig von Änderungen des pH-Wertes im Medium. Allerdings ist auch der Mechanismus, der zur Bildung der positiven Reaktion führt, noch nicht eindeutig geklärt. Die getesteten Organismen, *S. aureus*, DSM 20714^T und *P. pabuli* M1, wurden auf den Platten über einen Zeitraum von 8 Tagen bei einer Temperatur von 28°C inkubiert. Das Erscheinen lipolytischer Aktivität wird durch die Bildung von fluoreszierenden Höfen um die Kolonien herum angezeigt. Zur Beobachtung dieses Phänomens war es notwendig, die Platten

UV-Licht einer Wellenlänge von ca. 312 nm zu exponieren (Abb. 21 und 22). Ein Vergleich zwischen *P. pabuli* M1 und *S. aureus* zeigt, daß beiden Organismen durch dieses Verfahren, eine positive lipolytische Aktivität nachzuweisen ist. Diese tritt bei *P. pabuli* M1 äußerst gering in Erscheinung, während *S. aureus* eine ausgeprägt positive Reaktion hervorruft.

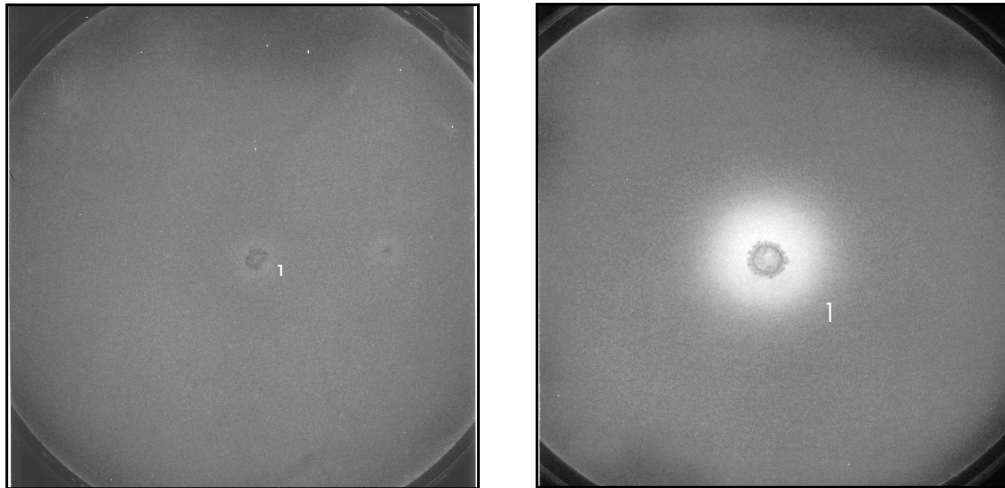


Abb. 21 und 22.

Darstellung von lipolytischer Aktivität auf Rhodamin B-Platten.

Auf der linken Abbildung ist *Paenibacillus pabuli* M1 und auf der rechten ist *Staphylococcus aureus* zu sehen. Beide Organismen wurden über einen Zeitraum von 8 Tagen bei 28°C inkubiert. Die Platten wurden mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt und fotografiert (2.1.11.3).

1: Fluoreszenz-Bildung am Rand der Kolonie.

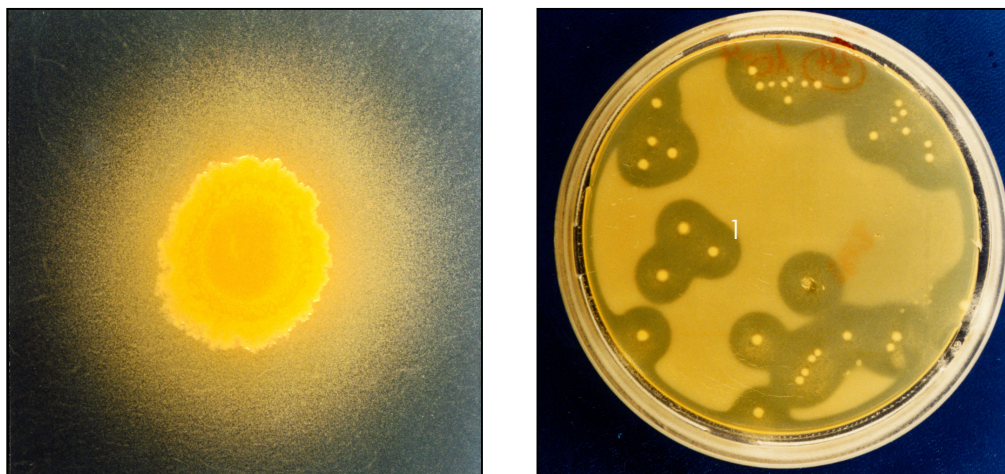


Abb. 23 und 24.

Darstellung lipolytischer Aktivität auf Tween 80-Medium im Vergleich zu Tributyrin-Agar.

Abb. 23 zeigt *Staphylococcus aureus* auf Tween 80-Medium. Deutlich ist die gelbe Kolonie erkennbar, an deren Rändern die typischen Ausfällungen von Ca^{2+} -Oleat sichtbar werden. Abb. 24 stellt *P. pabuli* M1 nach 8 Tagen Inkubation bei 28°C auf Tributyrin-Agar dar. Die positive Reaktion wird durch klare Höfe um die Kolonien sichtbar.

1: Trübungsklärung.

3.3.4 Tributyrin Agar-Platten

Eine weitere Methode zur Darstellung lipolytischer Aktivität stellen Tributyrin Agar-Platten dar (Abb. 24). In diesem Medium findet Tributyrin als Enzymsubstrat Verwendung. Diese Verbindung besteht aus einem GlycerinGrundgerüst, das an allen drei Positionen im Molekül mit Buttersäure über eine Esterbindung verknüpft ist. Die Aktivität extrazellulärer, lipolytischer Enzyme führt zu einer Trübungsklä rung in der Umgebung der Kolonien.

3.3.5 Vergleich von *Paenibacillus pabuli* M1 mit weiteren Organismen

Erste Untersuchungen an *Paenibacillus pabuli* M1 im Vergleich mit *Staphylococcus aureus* DSM^T 20714 hatten gezeigt, daß unterschiedliche mikrobiologische Tests zu nicht eindeutigen Aussagen über das Vorhandensein lipolytischer Aktivität führen (Abb. 19, 20 und 21, 22). Dieser Umstand sollte durch den Einsatz verschiedener Organismen (Tab. 2) und unterschiedlicher Medien (2.1.11.3 und 2.2.2) genauer untersucht werden. Außerdem liegen widersprüchliche Angaben dazu vor, unter welchen Bedingungen Organismen lipolytische Aktivität ausprägen (Bloquel und Veillet-Poncet, 1984; Brune und Götz, 1992). Es kamen u.a. verschiedene Tween-Verbindungen (Abb. 17, 18, 20, 23), Rhodamin B (Abb. 21, 22), Tributyrin (Abb. 24) sowie Kakaobutter und Pflanzenöl zum Einsatz. Tween-Verbindungen zeichnen sich im Gegensatz zu den anderen oben angeführten Enzymsubstraten dadurch aus, daß sie mit Fettsäuren einer genau definierten Kettenlänge substituiert sind. Auch bei Tributyrin handelt es sich um eine Glycerin-Verbindung, die an allen drei Positionen im Molekül mit Buttersäure verestert ist.

Bemerkenswert scheint dabei in jedem Fall die Tatsache zu sein, daß lediglich *Staphylococcus aureus* auf den untersuchten Medien in Gegenwart aller Substrate eine positive Reaktion zeigte (Tab. 4). Entgegen den Angaben im MERCK-Handbuch (1996) war *Escherichia coli* K12, der als negativer Kontrollorganismus eingesetzt wurde, auf Tween 60-Platten durchaus in der Lage, eine positive Reaktion hervorzurufen. In Gegenwart von Tween 80, einer Sorbitan-Ölsäure-Verbindung, zeigte nur *S. aureus* eine positive Reaktion. Diese Untersuchungen belegen eindeutig, daß verschiedene Lipase-Nachweisverfahren auf mikrobiologischer Ebene zu widersprüchlichen Angaben über das Vorliegen von lipolytischer Aktivität führen können. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde entschieden, das Screening auf erhöhte Lipase-Aktivität im Anschluß an die geplanten Mutagenisierungsarbeiten auf Tributyrin Agar-Platten zu führen, weil sich diese gegenüber den anderen Medien dadurch auszeichnen, daß die Aktivität der

lipolytischen Enzyme zur Bildung klarer Höfe um die Kolonien herum führt und damit ein quantitativer Vergleich zwischen den gescreenten Mutanten möglich ist.

Tab. 4. Mikrobiologischer Nachweis lipolytischer Aktivität.

Verschiedene Organismen wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen bei 28°C auf unterschiedlichen Medien inkubiert (2.1.11.3).

Organismen	Tween 20 (C12:0)*	Tween 40 (C16:0)*	Tween 60 (C18:0)*	Tween 80 (C18:1)*	Rhodamin B	Tributyrin (C4:0)*	Kakao- butter	Pflanzenöl
<i>S. aureus</i> ¹⁾	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> ²⁾ K 12	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> spec. C	+	+	+	-	W	+	-	-
<i>Bacillus</i> spec. P	+	+	+	-	W	+	-	-
<i>P. pabuli</i> M1	+	+	+	-	+	+	W	W
Kontrolle ³⁾	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾ positiver Kontrollorganismus,

²⁾ negativer Kontrollorganismus,

³⁾ unbeimpfte Medien,

+ positive Reaktion,

- negative Reaktion,

w (weak) schwache Reaktion,

* im Enzymsubstrat vorliegende Fettsäure.

3.4 Medienoptimierung

In den vorangegangenen Untersuchungsreihen waren verschiedene Medien auf ihre Eignung getestet worden, die mutagenisierten Stämme einem Screening-Verfahren auf erhöhte lipolytische Aktivität zu unterziehen. Tributyrin-Agarplatten hatten sich dafür als besonders geeignet erwiesen. Die folgenden Versuche sollten nun klären, welche Kultivierungsbedingungen bei *Paenibacillus pabuli* M1 eine optimale Ausprägung extrazellulärer lipolytischer Aktivität gewährleisten. Dazu wurden aus den getesteten Medien Platten hergestellt und beimpft, weil auf ihnen die lipolytische Reaktion anhand deutlich sichtbarer kristalliner Ausfällungen um die Kolonien herum erkennbar ist. Dieses Medium sollte anschließend dazu verwendet werden, den Organismus zu kultivieren, um im Kulturüberstand die extrazelluläre lipolytische Aktivität zu detektieren und Enzymkinetiken herzustellen.

Die Autoren Veillet-Poncet *et al.*, 1984, verweisen auf den Zusammenhang, daß einige Organismen nur in Gegenwart von peptonhaltigen, d.h. komplexen Medien, extrazelluläre lipolytische Aktivität ausprägen. Auch bilden einige Organismen konstitutiv lipolytische Enzyme, während bei anderen die Bildung von Lipasen einer Hemmung durch Glucose unterliegt. Aus diesem Grund wurden zunächst zwei unterschiedliche Medien, 2PHP₄₀-Platten sowohl mit als auch ohne Glucose, getestet (2.1.11.4). Das Beimpfen der Kulturen erfolgte nach einem standardisierten Verfahren (2.2.2). 2PHP₄₀-Medium ist ein komplexes Medium mit einem hohen Peptongehalt, dem zur Darstellung lipolytischer Aktivität Tween 40 hinzugefügt worden war.

Paenibacillus pabuli M1 zeigte auf 2PHP₄₀-Platten mit Glucose ein sehr gutes Wachstum. Nach 3 Tagen traten die typischen für die Tween-Reaktion verantwortlichen Ca²⁺-Kristalle auf. Die Zellen waren nicht versport und nach 5 Tagen Inkubation bei 28°C war die Ausfällung der Salze deutlich stärker zu erkennen als auf 2PHP₄₀-Platten ohne Glucose. Diese Ergebnisse lieferten einen ersten Hinweis darauf, daß der untersuchte Organismus in der Lage ist, auch in Gegenwart von Glucose lipolytisch-aktive Enzyme zu exprimieren.

3.4.1 Vergleich von *Paenibacillus pabuli* M1 mit weiteren Gram-positiven und -negativen Organismen

Die vorhergehenden Ergebnisse legten nahe, *Paenibacillus pabuli* M1 mit weiteren lipolytisch-aktiven Organismen zu vergleichen (Tab. 2). Dazu wurde zusätzlich zu 2PHP₄₀-Medium mit und ohne Glucose Mineralsalzbasis-Medium unter Verwendung von Tween 40 sowohl ebenfalls mit als auch ohne Glucose getestet (2.1.11.3; die Glucose- und Tween 40-

Zugabe erfolgte wie in 2PHP₄₀-Medium unter 2.1.11.4). Im Gegensatz zu diesen definierten Kulturbedingungen wurde in einem weiteren Ansatz der Einfluß von Glucose in dem komplexen 2PHP₄₀-Medium untersucht (2.1.11.4).

Pseudomonas fluorescens (Tab. 5) zeigte auf Mineralsalzbasis-Medium in Gegenwart von Glucose keine Tween-Reaktion. In Abwesenheit von Glucose fand demgegenüber eine ausgeprägte positive Reaktion statt.

Serratia marcescens bildete auf dem synthetischen Mineralsalz-Medium ohne Glucose wenig Biomasse, zeigte dagegen aber unter diesen Bedingungen eine ausgeprägte Tween-Reaktion. Durch diesen Versuchsaufbau konnte außerdem nachgewiesen werden, daß dieser Organismus in Gegenwart von Glucose viel Biomasse und eine deutlich geringer ausgeprägte lipolytische Aktivität zeigte.

Bei *Staphylococcus aureus* fand auf Mineralsalzbasis-Medium kein Wachstum statt. Allerdings zeigte sich auf 2PHP₄₀-Medium in Abwesenheit von Glucose eine deutlich stärkere Tween-Reaktion als in ihrer Anwesenheit.

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Organismen konnte bei *Paenibacillus pabuli* M1 auf allen getesteten Medien eine ausgeprägte lipolytische Aktivität nachgewiesen werden und es kann also davon ausgegangen werden, daß diese Enzyme konstitutiv gebildet und nicht durch Glucose gehemmt werden. Allenfalls *Serratia marcescens* zeigte vergleichbare Fähigkeiten. Auch dieser Organismus war in der Lage, auf allen getesteten Medien eine lipolytische Aktivität auszuprägen.

Tab. 5. Ein Vergleich zwischen Mineralsalzbasis-Medium mit Tween 40 und 2PHP₄₀-Medium.

Es wurde der Einfluß von Glucose getestet. Dazu wurden verschiedene Organismen über einen Zeitraum von 14 Tagen bei 28°C inkubiert.

Organismen	Mineralsalzbasis-Medium + Tween 40				2PHP ₄₀ -Medium			
	Glucose		ohne Glucose		Glucose		ohne Glucose	
	Wachstum**	Tween-Reaktion*	Wachstum**	Tween-Reaktion*	Wachstum**	Tween-Reaktion*	Wachstum**	Tween-Reaktion*
<i>Ps. fluorescens</i>	+	keine	+	0.2 cm	+	unter der Kolonie	+	0.7 cm
<i>S. marcescens</i>	+	0.3 cm	+	0.9 cm	+	0.7 cm	+	1.2 cm
<i>S. aureus</i>	-	keine	-	keine	+	0.5 cm	+	1.0 cm
<i>P. pabuli</i> M1	+	0.5 cm	+	0.5 cm	+	1.0 cm	+	1.0 cm

***Tween-Reaktion:** Die Angaben beziehen sich auf die Bildung der Ca²⁺-Ausfällungen abzüglich der Koloniengröße [cm].

****Wachstum:** + positive Reaktion, - negative Reaktion.

3.5 Entwicklung eines Enzym-Assays zur Ermittlung lipolytischer Aktivität

In der Literatur finden sich eine große Anzahl von Verfahren zur Ermittlung lipolytischer Aktivität (Vorderwülbecke, 1990). Ratledge (1994) beschreibt sogar den Umstand, daß jedes Labor nach eigenen Protokollen vorgeht und ein Vergleich der dadurch erzielten Ergebnisse großen Schwierigkeiten unterliegt. Aus diesem Grund wurde in Voruntersuchungen ein colorimetrischer Lipase-Nachweis des Herstellers Roche getestet (2.1.1: 27). Dieser verwendet eine 1,2-O-Dilauryl-rac-Glycero-3-Glutarsäure-Resorufinester-Verbindung als Enzymsubstrat, welches mit Thesit-Dioxan im Verhältnis 1:2 (v/v) emulgiert wird. Im Kulturüberstand von *Paenibacillus pabuli* M1 konnte mit dieser Methode jedoch kein Umsatz nachgewiesen und somit auch keine lipolytische Aktivität detektiert werden. Im Gegensatz dazu stand die Beobachtung lipolytischer Aktivität auf mikrobiologischer Ebene (Tab. 4 und 5). Dieser Sachverhalt und die daraus abgeleitete Fragestellung führte zu der Überlegung, aus beschriebenen Methoden bestimmte Verfahrensabläufe zu entnehmen und diese auf ihre Anwendbarkeit sowie Reproduzierbarkeit zu überprüfen und anschließend gegebenenfalls zu modifizieren. Grundlegend ist davon auszugehen, daß ein Verfahren zur Ermittlung lipolytischer Aktivität sich im wesentlichen aus den folgenden Punkten zusammensetzen sollte:

- (a) Kultivierungsbedingungen
- (b) Einsatz unterschiedlicher Enzymsubstrate
- (c) Emulgation der Enzymsubstrate
- (d) mögliche Konzentration der Enzyme vor dem Nachweis
- (e) Nachweisverfahren

Die vorangegangenen Ergebnisse hatten zu der Entscheidung geführt (3.4.1), *Paenibacillus pabuli* M1 auf 2PHP₄₀-Medium ohne Glucose zu kultivieren (a). Die weiteren Verfahrenspunkte (b-e) sollten in den folgenden Untersuchungen geprüft werden.

3.5.1 Überprüfung der Stabilität des Enzymsubstrates

Das Problem von positiven Kontrollansätzen in den Voruntersuchungen führte zu der Annahme, daß das β -Naphthylstearat (Sigma) als Enzymsubstrat auch bei vorschriftsmäßiger Lagerung und Handhabung nicht lange genug stabil bleibt. Es sollte nun das Ausmaß geprüft werden, im dem bereits die Emulgationsmethode einen Einfluß auf die Stabilität des Enzymsubstrates aufweist oder ob β -Naphthyl-Verbindungen grundsätzlich als

Enzymsubstrate nicht geeignet sind.

β -Naphthyl-Stearat wurde deshalb zum einen durch Zugabe von Thesit-Dioxan und zum anderen durch Tween 60 emulgiert. Der Kontrollansatz bestand aus β -Naphthyl-Stearat und destilliertem Wasser. Alle Nachweise wurden in jeweils drei Parallelen geführt (2.2.7.1.1 bis 2.2.7.1.3). In allen Ansätzen fand eine positive Farbreaktion statt, sogar die Kontrollen fielen positiv aus (2.2.7.1.3). Damit war die anfangs formulierte Annahme erwiesen, daß β -Naphthyl-Stearat auch bei vorschriftsmäßiger Lagerung nicht lange genug stabil bleibt, um in dieser Form als Enzymsubstrat eingesetzt werden zu können. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf der Arbeiten die chemisch stabileren α -substituierten Naphtholverbindungen verwendet.

3.5.2 Überprüfung weiterer Emulgationsmethoden: Lecithin-Glycerin und Gum arabicum-Deoxycholsäure

Des weiteren sollten nun zwei zusätzliche Emulgationsverfahren auf ihre Eignung geprüft werden. Begonnen wurde mit einer Methode, die von Haslbeck (1985) zur Emulgation hydrophober Enzymsubstrate empfohlen wird (2.2.7.1.5).

Die Überprüfung dieses Verfahrens wurde zunächst durch den Einsatz einer kommerziell bezogenen und gereinigt vorliegenden Lipase aus *Candida cylindracea* der Firma Sigma getestet (2.1.10). Die Lipase wurde in Gegenwart der α -Naphthylstearat-Emulsion inkubiert und gegen eine Kontrolle, die aus Puffer und Enzymsubstrat-Emulsion bestand, verglichen. Auch hier zeigte sich in dem Kontrollansatz eine leichte Farbreaktion.

Nach dem gleichen Schema wurde anschließend die Gum arabicum-Deoxycholsäure- α -Naphthylstearat Emulgationsmethode überprüft (2.2.7.1.6). In diesem Fall blieben die mitgeführten Kontrollansätze negativ und aus diesem Grund wurde entschieden, in allen weiteren Arbeiten diese Methode zur Emulgation hydrophober Enzymsubstrate anzuwenden.

3.5.3 Nachweis von Exoproteasen im Kulturüberstand

Bis zu diesem Zeitpunkt gewährleistete die bisher etablierte Verfahrensweise in keinem Ansatz die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Aus diesem Grund sollte nun geprüft werden, ob von den untersuchten Organismen Exoproteasen in das Medium abgegeben wurden. Zum Nachweis einer proteolytischen Aktivität im Medium wurde Caseinabbau (2.1.11.5) getestet. Die Mehrzahl der untersuchten Organismen zeigten positive Ergebnisse (Tab. 6).

Damit war der Nachweis von Proteasen geführt und es wurde an dieser Stelle entschieden, dem Kulturüberstand direkt nach dem Abzentrifugieren der Zellen ein Protease Inhibitor-Cocktail hinzuzufügen (2.1.1).

Tab. 6. Casein-Abbau. Nachweis proteolytischer Aktivität bei verschiedenen Organismen.

Organismen	Proteolytische Aktivität
<i>Paenibacillus pabuli</i> M1	+
<i>Bacillus spec. C</i>	+
<i>Bacillus spec. P</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+
<i>Serratia marcescens</i>	+

+ positive Reaktion, - negative Reaktion.

3.5.4 Ammoniumsulfat-Fällung

Weiterhin wurde eine Anreicherung der im Kulturüberstand vorliegenden Exoenzyme von *P. pabuli* M1 durch eine Ammoniumsulfat-Fällung untersucht (2.2.5). Die dabei erzielte Ausbeute an Proteinen im Präzipitat konnte in keinem Ansatz über 11.5% gesteigert werden. Unter Berücksichtigung dieser und der Ergebnisse in 3.5.6 wurde entschieden, in der Durchführung des Enzym-Assays auf eine Konzentration der Proteine im Kulturüberstand zu verzichten.

3.5.5 Überprüfung des sterilen Mediums auf lipolytische Aktivität

Der Nachweis einer extrazellulären lipolytischen Aktivität sollte, wie in der Literatur beschrieben wird, geführt werden, ohne den erheblichen Aufwand einer Auftrennung der im Kulturüberstand vorliegenden Exoenzyme und deren Isolierung zu betreiben (McKellar, 1986). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob von den im Medium vorliegenden Bestandteilen ein Einfluß auf die Bestimmung der Lipase-Aktivität ausgehen.

An dieser Stelle wurde außerdem eine weitere Modifikation des Verfahrensablaufes eingeführt. Zuvor war ausschließlich mit α -Naphthyl-Stearat als Enzymsubstrat gearbeitet worden. Das Spektrum der verwendeten Enzymsubstrate wurde nun dahingehend erweitert, daß zusätzliche Verbindungen, die mit unterschiedlich langen Fettsäuren substituiert waren,

zum Einsatz kamen (2.1.1: 43-51). Die Emulgation der Verbindungen erfolgte mittels Gum arabicum und Deoxycholsäure (2.2.7.1.6). Für alle getesteten Enzymsubstrate lag die ermittelte lipolytische Aktivität im sterilen Medium bei Null.

3.5.6 Ermittlung einer Nachweisgrenze für das untersuchte Verfahren

100 ml steriles 2PHP₄₀-Medium wurden mit unterschiedlichen Mengen einer kommerziell erworbenen Lipase der Firma Sigma aus *Candida cylindracea* versehen. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Abb. 25 zusammengefaßt. Die Ergebnisse belegen, daß sich Enzymaktivitäten bis zu einer Konzentration von 0.01 mg Enzym in einem Liter Medium mit dieser Methode nachweisen lassen. Nach Godtfredsen (1989) ergeben sich Erträge für Exolipasen in einer Größenordnung von mg/Liter. Gemäß diesen Angaben ist davon auszugehen, daß das vorliegende Verfahren in der Lage ist, Exolipasen ohne weitere Konzentration der im Kulturüberstand vorliegenden Enzyme zu erfassen.

3.5.7 Zusammenfassung des Verfahrensablaufes

Die geringe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse konnte zum einen auf das Vorhandensein von Proteasen im Kulturüberstand zurückgeführt werden. Der Verfahrenablauf wurde aus diesem Grund um die Zugabe eines Protease Inhibitor-Cocktails (2.1.1, Sigma P 2714) erweitert. Zum anderen wurden Emulgationsmethoden für die hydrophoben Enzymsubstrate untersucht und anhand der vorliegenden Ergebnisse entschieden, in den folgenden Arbeiten ein Verfahren zu benutzen, das Gum arabicum und Deoxycholsäure (2.2.7.1.6) zur Emulgation der Substrate verwendet. Außerdem wurden die Organismen in 2PHP₄₀-Flüssigmedium ohne Glucose (2.1.11.4) über einen Zeitraum von 5 Tagen bei 28°C auf dem Schüttler inkubiert (3.4). Es konnte weiterhin der Nachweis geführt werden, daß von den eingesetzten Medienkomponenten kein Einfluß auf die ermittelte lipolytische Aktivität ausgeht. Außerdem wurde die Nachweisgrenze des Verfahrens bezüglich der eingesetzten Enzymmengen getestet und die Effektivität einer Ammoniumsulfatfällung unter gegebenen Umständen geprüft. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde auf eine Konzentration der extrazellulären Enzyme durch die Ammoniumsulfat-Fällung verzichtet.

3.5.8 Lipase-Assay

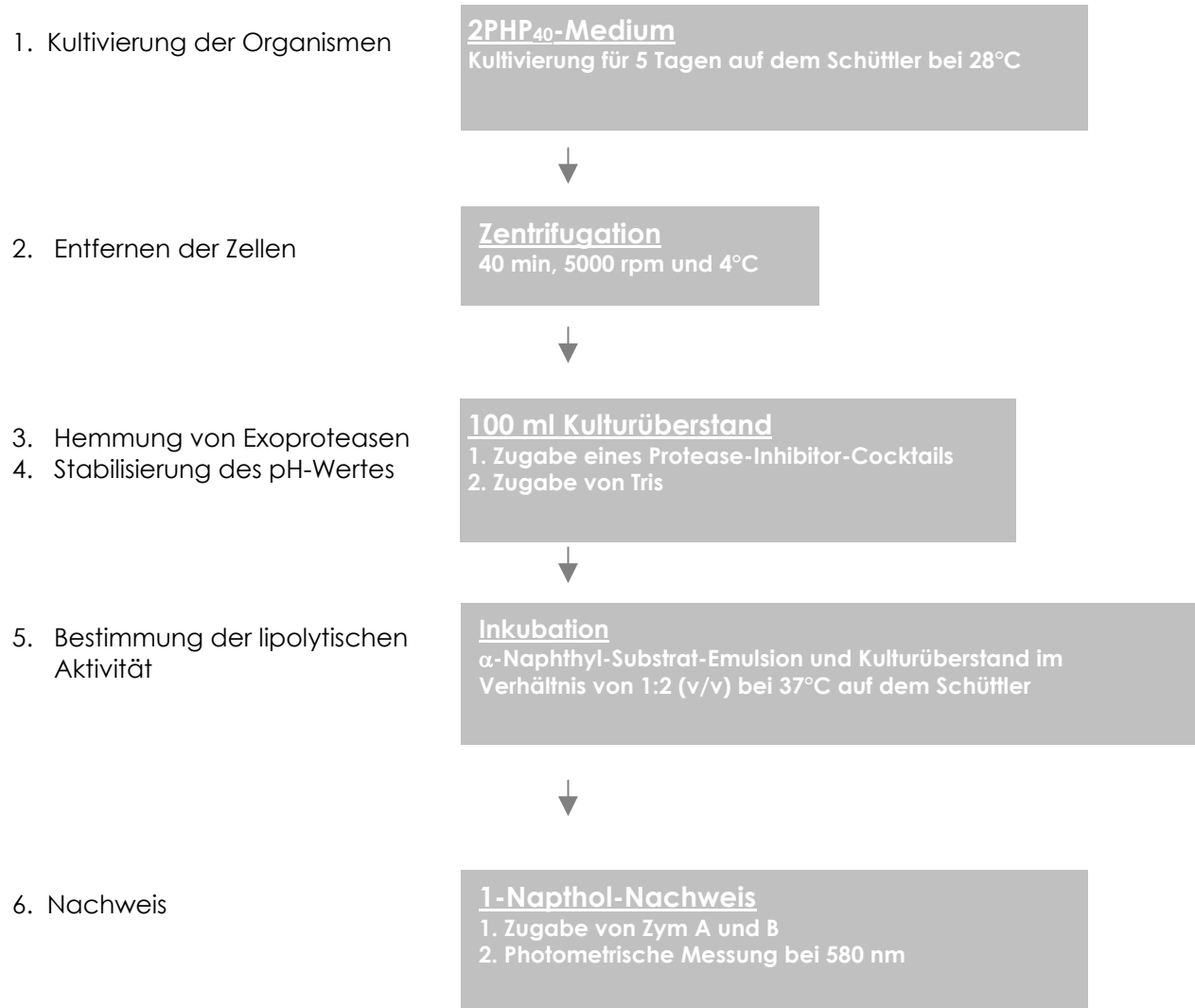


Abb. 25.

Lipase-Assay. Das Schema faßt die einzelnen Schritte des etablierten Verfahrens zusammen.

3.6 Enzym-Kinetiken

3.6.1 Extrazelluläre lipolytische Aktivität

Bei der Durchführung von Lipase-Kinetiken wurden neun unterschiedliche Enzymsubstrate verwendet (2.1.1: 43-51). Diese Verbindungen unterschieden sich durch die Kettenlängen der gebundenen Fettsäuren. Damit wurde das Spektrum der Fettsäure-Verbindungen

zwischen Buttersäure (C4:0) und Ölsäure (C18:1), bzw. Stearinsäure (C18:0) untersucht. Entsprechend der Länge der am Naphthol-Doppelring substituierten Fettsäuren ließen sich erheblich voneinander abweichende Geschwindigkeiten bei der Umsetzung der Enzymsubstrate ermitteln.

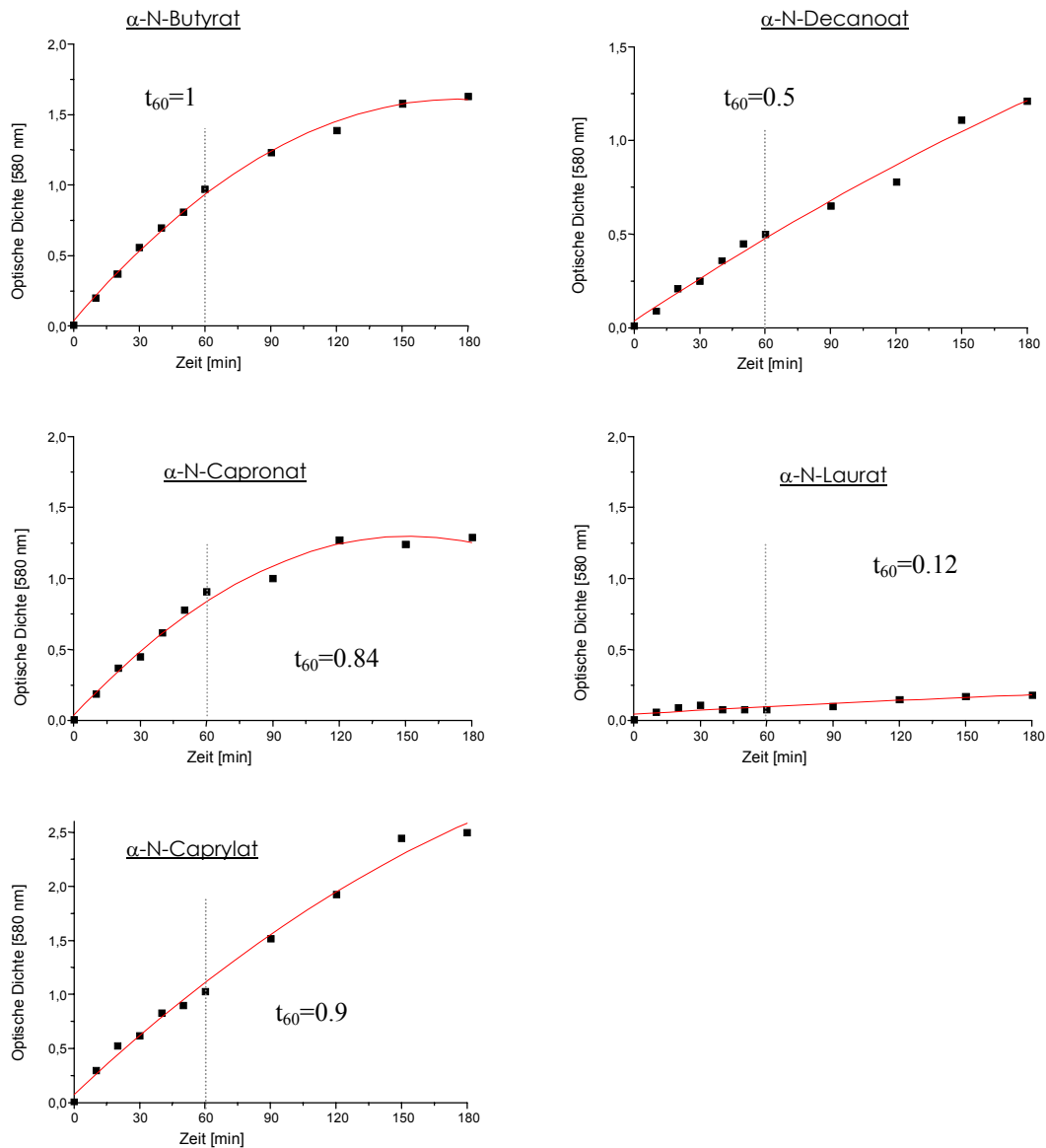
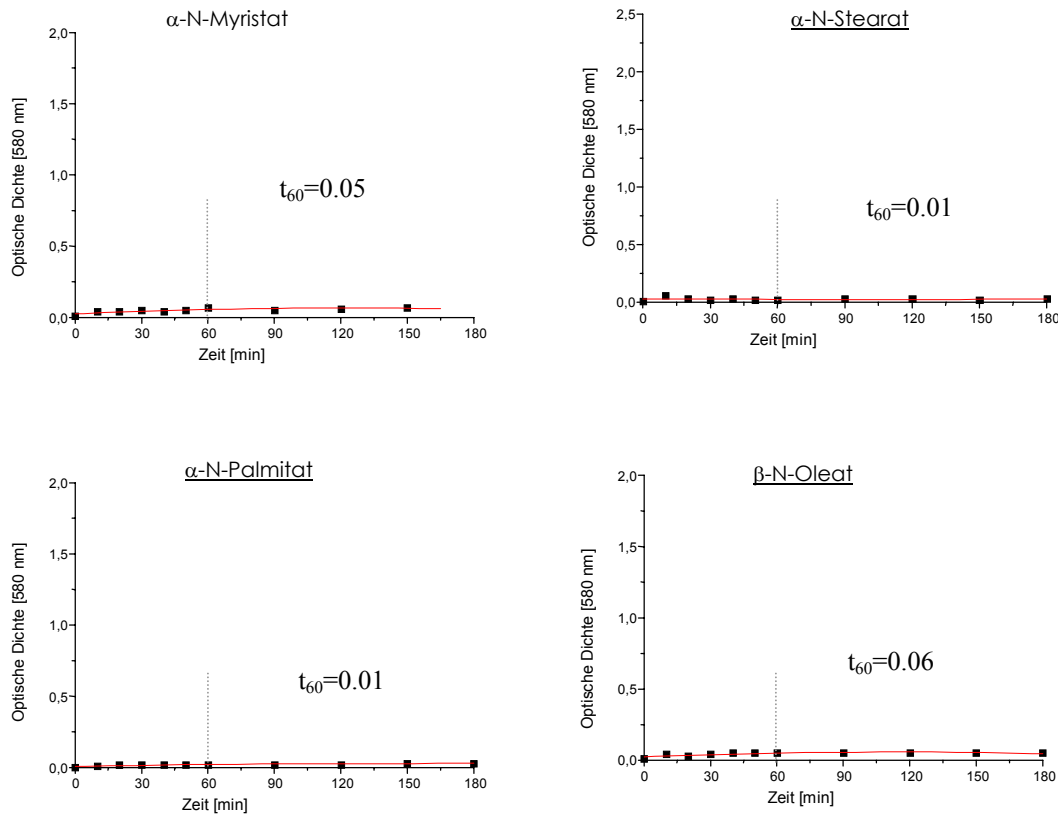


Abb. 26.

Enzym-Kinetiken für extrazelluläre lipolytische Enzyme aus dem Kulturüberstand von *Paenibacillus pabuli* M1.

Die Kinetiken wurden unter Verwendung von α-N-Butyrat, -Capronat, -Caprylat, -Decanoat und -Laurat angefertigt und über einen Zeitraum von 180 min gemessen (2.2.7.3).

t_{60} : Umsatz des Enzymsubstrates nach 60 Minuten Inkubation.

**Abb. 27.**

Enzym-Kinetiken für extrazelluläre lipolytische Enzyme aus dem Kulturüberstand von *P. pabuli* M1. Die Aktivitätsmessungen wurden unter Verwendung von α -N-Myristat, -Palmitat, -Stearat und -Oleat über einen Zeitraum von 180 Minuten durchgeführt.

t_{60} : Umsatz des Enzymsubstrates nach 60 Minuten Inkubation.

Die kurzkettigen Fettsäure-Verbindungen, α -N-Butyrat, -Capronat und -Caprylat, zeigten bei einer Inkubationsdauer von 60 Minuten Werte, die einer OD von 1, 0.84 und 0.9 entsprachen. α -N-Decanoat (C10:0) erreichte zu diesem Zeitpunkt eine optische Dichte von 0.5, während α -N-Laurat mit einer Fettsäurekettenlänge von C12:0 bei einer Beobachtungsdauer von 60 Minuten noch Werte von 0.12 erzielte. Unter Verwendung aller weiterer α -Naphthol-Verbindungen konnten nur noch äußerst geringe Restaktivitäten nachgewiesen werden.

Durch diese Beobachtungen läßt sich allgemein feststellen, daß die im Kulturüberstand vorliegenden Enzyme von *Paenibacillus pabuli* M1 in der Lage sind, Fettsäuren einer Kettenlänge von C4:0 bis C12:0 aus einer Esterbindung zu spalten. Dagegen werden alle längerkettigen Fettsäurenverbindungen, unabhängig davon, ob sie eine Doppelbindung aufweisen, in nicht nennenswerter Weise umgesetzt.

3.6.2 Zelluläre lipolytische Aktivität

Im Gegensatz zur Durchführung von Kinetiken für extrazelluläre, im Kulturüberstand vorliegende, lipolytische Enzyme wurde *Paenibacillus pabuli* M1 für die vorliegende Untersuchungsreihe auf PHP²₄₀-Platten kultiviert und die Zellen anschließend mit der French Press aufgeschlossen (2.2.7.3.2).

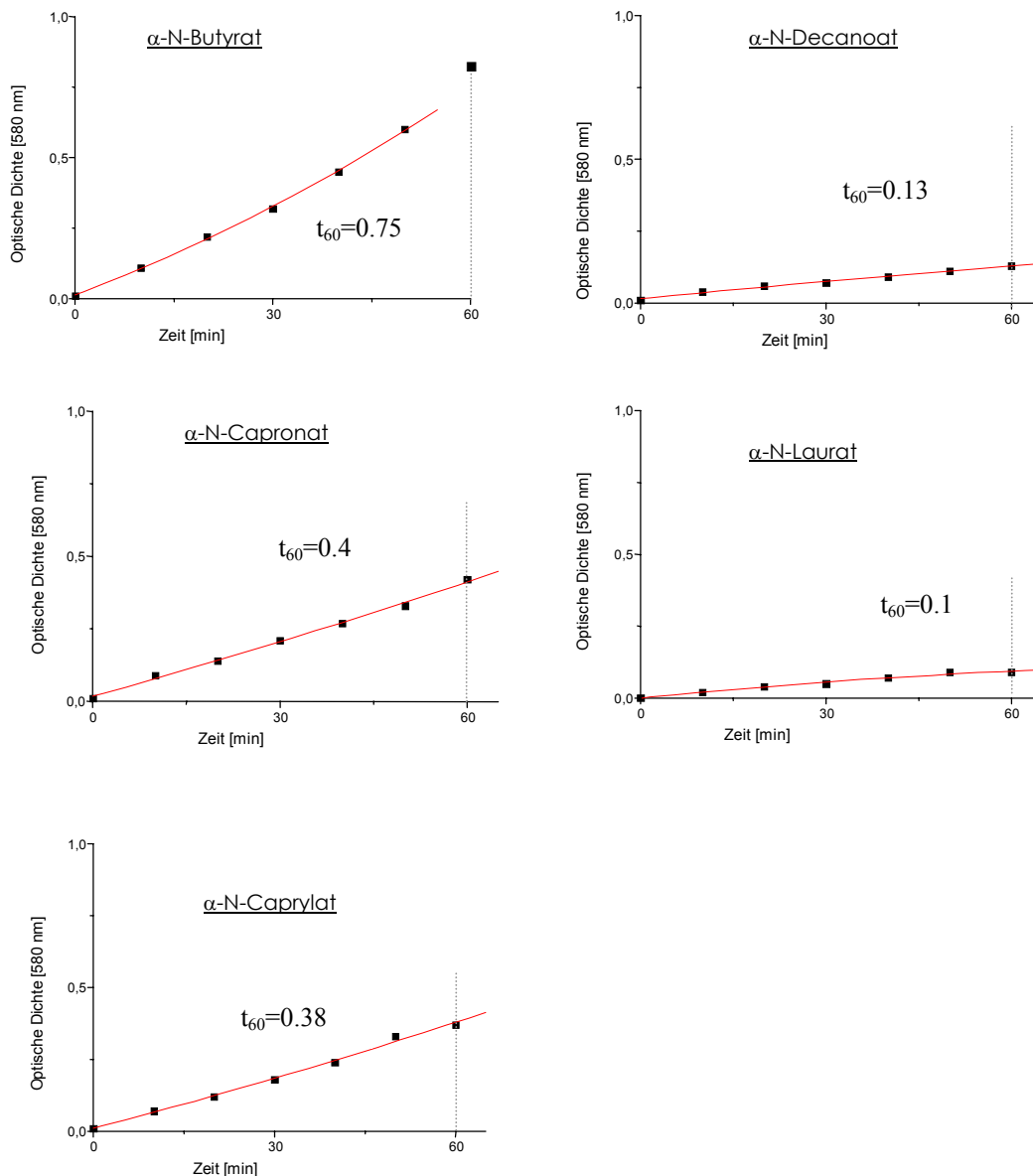
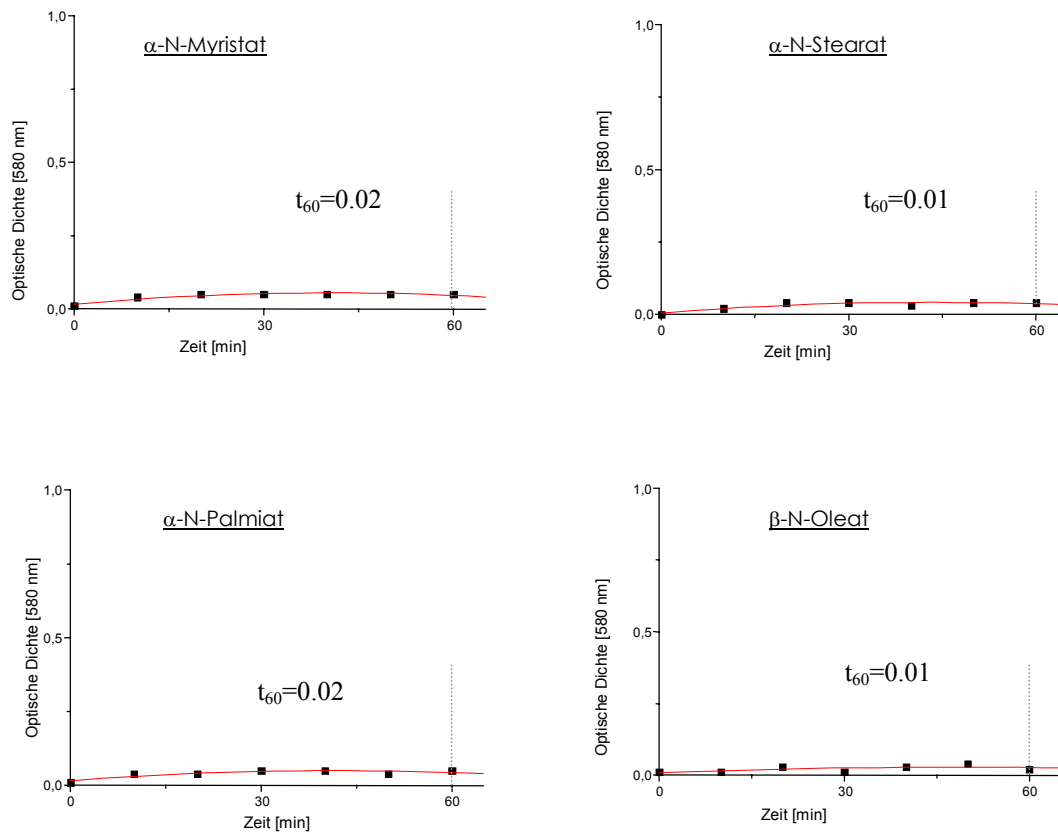


Abb. 28.

Enzym-Kinetiken für zelluläre lipolytische Enzyme aus dem Rohextrakt von *P. pabuli* M1. Die Darstellungen wurden unter Verwendung von α -N-Butyrat, -Capronat, -Caprylat, -Decanoat und -Laurat angefertigt und über einen Zeitraum von 60 Minuten gemessen.

t_{60} : Umsatz des Enzymsubstrates nach 60 Minuten Inkubation.

**Abb. 29.****Enzym-Kinetiken für zelluläre lipolytische Enzyme aus dem Rohextrakt von *P. pabuli* M1.**

Die Aktivitätsmessungen wurden unter Verwendung von α-N-Myristat, -Palmitat, -Stearat und -Oleat über einen Zeitraum von 60 Minuten durchgeführt.

t_{60} : Umsatz des Enzymsubstrates nach 60 Minuten Inkubation.

Es zeigte sich eine mit der extrazellulären lipolytischen Aktivität vergleichbare Tendenz, daß lediglich kurz- bis mittelkettige Fettsäuren im Bereich zwischen C4:0 bis C12:0 umgesetzt wurden (Abb. 26-27 und 28-29). Die zellulären Enzyme dieses Organismus waren ebenfalls nicht in der Lage, langkettige Fettsäure-Verbindungen umzusetzen. Alle zellulär gemessenen Werte lagen dabei deutlich unter denen für extrazelluläre Aktivität. In Gegenwart von α-N-Decanoat und -Laurat ließen sich Werte ermitteln, die noch entsprechend einer Kinetik dargestellt werden konnten. Sie wiesen bei einer Inkubationsdauer von 60 Minuten Werte von 0.13 und 0.1 auf. Die kurzkettigen Enzymsubstrate (Abb. 28) wurden allerdings deutlich schneller umgesetzt als alle längerkettigen Naphtholverbindungen. Unter Verwendung dieser langkettigen Verbindungen konnten im Rohextrakt ebenfalls nur noch geringe Restaktivitäten nachgewiesen werden (Abb. 29).

3.6.3 Vergleich von zellulärer und extrazellulärer Enzymaktivität

Der Auftrag der zum Zeitpunkt [t_{60}] ermittelten Werte für zelluläre und extrazelluläre lipolytische Aktivität gegen unterschiedliche Enzymsubstrate, veranschaulicht das Potential des untersuchten Organismus Enzymsubstrate bis zu einer Kettenlänge von C12:0 umzusetzen (Abb. 30).

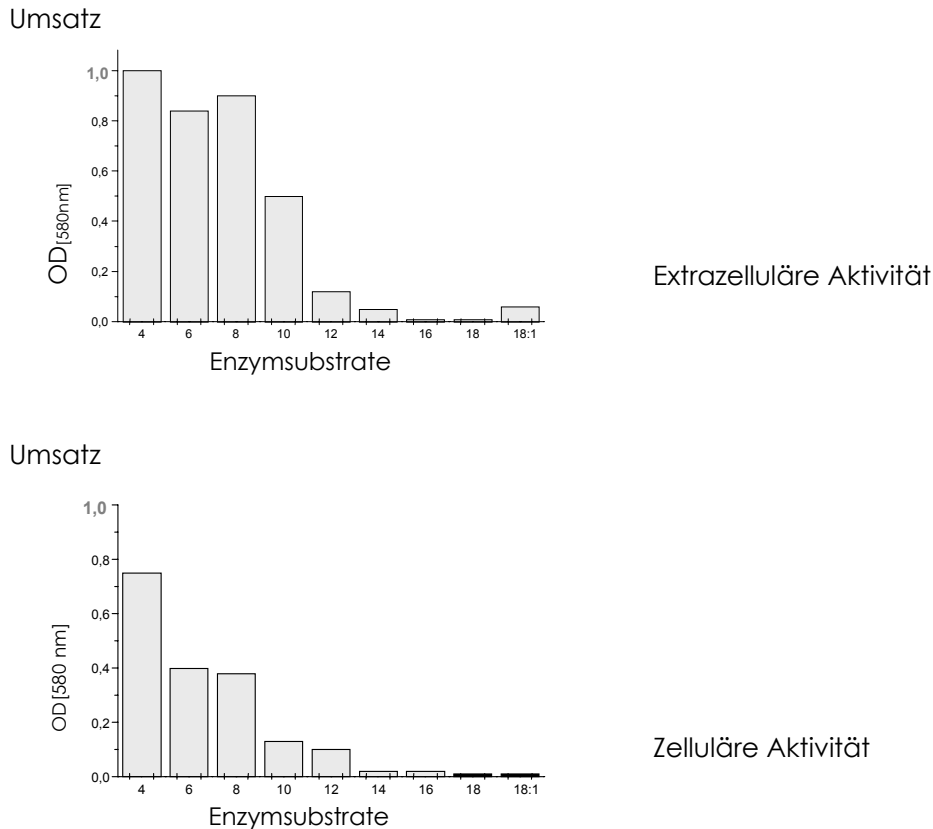


Abb. 30.

Vergleich der Kettenlängenspezifität von zellulärer und extrazellulärer Aktivität bei *P. pabuli* M1.

Aufgetragen wurden der Umsatz zum Zeitpunkt t_{60} (Inkubationsdauer von 60 Minuten) der neun getesteten Enzymsubstrate, die mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge substituiert waren.

4: α -N-Butyrat (C4:0),	14: α -N-Myristat (C14:0),
6: α -N-Capronat (C6:0),	16: α -N-Palmitat (C16:0),
8: α -N-Caprylat (C8:0),	18: α -N-Stearat (C18:0),
10: α -N-Decanoat (C10:0),	18:1: β -N-Oleat (C18:1).
12: α -N-Laurat (C12:0),	

3.6.4 Kettenlängenspezifität weiterer Organismen

Die vorangegangenen Kinetiken und Darstellungen der Kettenlängenspezifität bei *P. pabuli* M1 hatten bereits einen eindeutigen Hinweis darauf ergeben, daß die im Kulturüberstand und im Rohextrakt des Organismus vorliegenden lipolytische Enzyme bestimmte Fettsäuren deutlich schneller umsetzen als andere (Abb. 30). Aus den vorliegenden Daten, die zur Anfertigung von Kinetiken bei vier weiteren Organismen benutzt worden waren (Abb. A1-A8), wurden nun ebenfalls jene Werte für die *extrazelluläre lipolytische Aktivität* entnommen, die nach 60 minütiger Inkubation als Endpunkte ermittelt worden waren und für jedes Substrat aufgetragen. Ein Vergleich dieser Profile verweist ganz eindeutig auf die Tendenz von *Paenibacillus pabuli* M1, kurz- und mittelkettige Fettsäuren bis zu einer Länge von 10 Kohlenstoffatomen umzusetzen (Abb 30). Im Vergleich dazu hydrolysiert *Pseudomonas fluorescens*, DSM 50090^T, noch Myristinsäureverbindungen, allerdings nur noch mit einer deutlich geringeren Aktivität (Abb. 31). Von allen untersuchten prokaryontischen Enzymen zeigte ausschließlich *Staphylococcus aureus* ein Aktivitätsprofil, das eindeutig einer Lipase zuzuordnen war, weil auch langkettige Verbindungen umgesetzt wurden. Darüber hinaus deutet der signifikante Unterschied im Umsatz von α -N-Butyrat zu allen anderen Substraten darauf hin, daß sowohl eine Esterase als auch eine Lipase im untersuchten Kulturüberstand vorliegen könnten. Demgegenüber konnte bei *Bacillus licheniformis* zweifelsfrei die Aktivität einer Esterase nachgewiesen werden. Von allen Enzymen zeigte die Lipase aus *Candida rugosa* über das gesamte Spektrum der untersuchten Fettsäuren einen eindeutig nachweisbaren Umsatz. Ein Vergleich der in den Kulturüberständen der verschiedenen Organismen detektierten Enzymaktivitäten anhand ihrer Kettenlängenspezifität führte an dieser Stelle zu der Entscheidung, bei *P. pabuli* M1 von der Aktivität einer Esterase auszugehen.

1. *Bacillus licheniformis* DSM 13^T

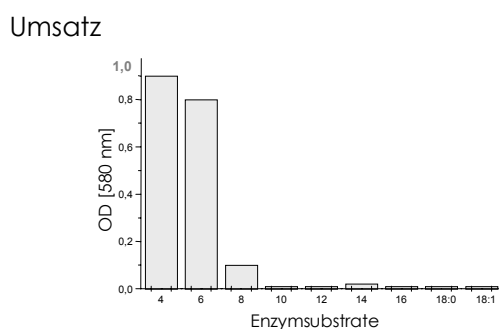
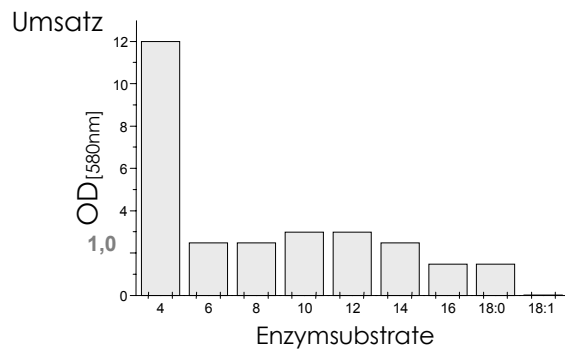
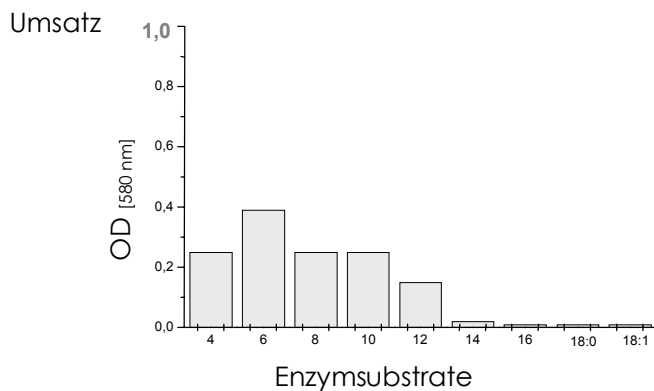
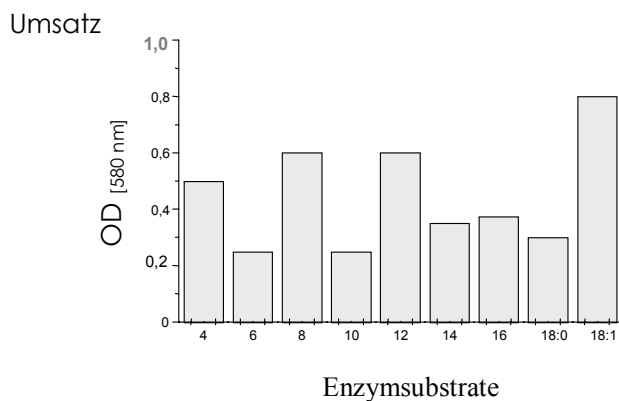


Abb. 31.
Kettenlängenspezifität verschiedener Organismen im Vergleich.
 Erklärung: siehe Abb. 31. Fortsetzung.

2. *Staphylococcus aureus* DSM 20714^T3. *Pseudomonas fluorescens*, DSM 50090^T4. *Candida rugosa* : 1 Unit**Abb. 31.****Kettenlängenspezifität verschiedener Organismen.**

Es wurden neun Enzymsubstrate untersucht. Diese unterschieden sich durch veränderte Fettsäure-Kettenlängen. Die dargestellten Werte wurden als Endpunkte zum Zeitpunkt t_{60} ermittelt.

4: α -Naphthol-Butyrat, **6:** α -Naphthol-Capronat, **8:** α -Naphthol-Caprylat, **10:** α -Naphthol-Decanoat, **12:** α -Naphthol-Laurat, **14:** α -Naphthol-Myristat, **16:** α -Naphthol-Palmitat, **18:0** α -Naphthol-Stearat, **18:1:** α -Naphthol-Oleat.

3.7 Mutagenisierungsarbeiten an *Paenibacillus pabuli* M1

Nachdem die lipolytische Aktivität von *Paenibacillus pabuli* M1 zuvor sowohl hinsichtlich der Aufnahme und Verwertung bestimmter Fettsäuren gaschromatographisch als auch bezüglich der Spaltung spezifischer Fettsäuren aus Esterbindungen untersucht worden war, sollte dieser Ausgangsstamm in einem anschließenden Verfahren mutagenisiert werden. Zielsetzung dabei war es, die lipolytische Aktivität zu optimieren. Es wurden vier unterschiedliche Methoden zur Mutagenisierung des gewählten Organismus angewendet. Zunächst wurde UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm benutzt. Daraufhin erfolgte die Behandlung mit Nitrosoguanidin (NTG) und anschließend wurden UV- mit NTG-Mutagenese kombiniert angewendet. In einem abschließenden Verfahren wurden Kupfer(II)Chlorid-Ionen während der Behandlung mit UV-Licht hinzugefügt (2.2.9.4).

3.7.1 Ermittlung der Strahlendosis für UV_{254 nm}

Für die Mutagenisierungsarbeiten mit UV-Licht wurde eine Lampe der Marke UV-Universal, Camag TL-900, benutzt. Es wurde zunächst mit einem UV-Meßgerät die Strahlendosis an jener Stelle ermittelt, an der später die Zellen dem UV-Licht ausgesetzt wurden. Dabei ergaben sich Werte von 500 erg/mm². Diese Strahlenmenge entsprach den Angaben, die von den Autoren Carlton und Brown (1981) empfohlen wird.

3.7.2 Ermittlung der Lethalitätsrate für UV_{254 nm}

Um ein geeignetes Verhältnis zwischen Strahlendosis und der Anzahl abgestorbener Zellen zu ermitteln, war es zunächst notwendig, eine Lethalitätsrate für UV-Licht zu ermitteln. Carlton und Brown (1981) empfehlen Werte in einem Bereich von 0.1 bis 1.0% überlebender Zellen. Bei der verwendeten UV-Quelle ergaben sich nach 4 bis 5 Minuten Bestrahlung mit UV-Licht Überlebensraten von 0.4 bzw. 0.08%. Entsprechend diesen Ergebnissen wurden alle späteren Arbeiten unter Einhaltung einer vierminütigen Expositionszeit durchgeführt.

3.7.3 Ermittlung der Lethalitätsrate für NTG

Eine 55minütige Inkubation der Zellen in Gegenwart von 500 mg/ml NTG zeigte nach Auswertung der Verdünnungsausstriche eine 10%ige Überlebensrate. Die Autoren Carlton und Brown (1981) empfehlen mit höheren Überlebensraten als bei der UV-Mutagenese zu

arbeiten, weil NTG Cluster von Mutationen erzeugt. Entsprechend den oben genannten Ergebnissen und diesen Angaben wurden die Zellen anschließend über einen Zeitraum von 55 Minuten in Gegenwart von NTG mutagenisiert.

3.7.4 Screening auf erhöhte lipolytische Aktivität

Nachdem die Zellen des Wildtyps von *Paenibacillus pabuli* M1 verschiedenen Mutagenisierungsprozeduren ausgesetzt worden waren (2.2.9), wurden sie verdünnt und anschließend auf Tributyrin Agar-Platten (2.1.11.3) einem Screening-Verfahren unterzogen. Die Bildung unterschiedlich großer, klarer Höfe um die Kolonien herum wurde als Hinweis auf eine veränderte Esterase-Aktivität gewertet.

Tributyrin Agar-Platten zeichnen sich gegenüber anderen Medien (Abb. 24 in Kapitel 3.3), die zur Beobachtung extrazellulärer lipolytischer Aktivität verwendet werden, dadurch aus, daß die Kolonien gut erkennbare klare Höfe ausprägen. Um eine Quantifizierung zu erreichen, wurden die verwendeten Tributyrin Agar-Platten nach einem standardisierten Verfahren hergestellt und beimpft (2.2.2). Beim Vergleich der Größe der gebildeten Höfe zwischen dem Wildtyp von *P. pabuli* M1 und den mutagenisierten Stämmen wurden diejenigen Kolonien gescreent, die nach 7 Tagen Inkubation auf Tributyrin Agar-Platten bei 28°C im wesentlichen zu 150% vergrößerte klare Zonen bildeten. Diese Stämme wurden anschließend auf Casein-Sojapepton-Agarplatten übertragen (2.1.11.2) und als Glycerin-Kulturen (2.2.1.2) gesichert. Aus unterschiedlichen Ansätzen konnten insgesamt 60 Kolonien, von ca. 15000 insgesamt gescreenten, festgestellt werden, die signifikant größere Höfe aufwiesen (Tab. 8).

3.7.5 Ermittlung der lipolytischen Aktivität im Wildtyp

Zu Beginn der weiteren Untersuchungen wurde der Wildtyp von *Paenibacillus pabuli* M1 in Hinblick auf seine lipolytische Aktivität in 20 strikt getrennt voneinander behandelten Parallelmessungen untersucht. Dabei wurden alle Daten in wiederum drei parallelen Messungen gesichert (Tab. 7). Diese Werte dienten außerdem als Kontrollansätze für die Messungen lipolytischer Aktivität der mutagenisierten Stämme (Tab. 8).

Dieser Vergleich wurde geführt, indem die Zellen über einen Zeitraum von 5 Tagen auf 2PHP₄₀-Medium ohne Glucose bei 28°C auf dem Schüttler inkubiert wurden (2.1.11.4). Die Ermittlung der Enzymaktivität folgte im wesentlichen den Angaben unter 2.2.7.3. Der

Verfahrensablauf wurde für diese Versuchsreihe dahingehend modifiziert, daß keine Kinetiken über einen längeren Zeitraum gemessen wurden, sondern der Kulturüberstand in Gegenwart von α -Naphthyl-Caprylat als einzigem Enzymsubstrat bei 37°C im Wasserbadschüttler inkubiert wurde. Nach einer Stunde [t_{60}] erfolgte der Nachweis von freigesetztem 1-Naphthol durch die Zugabe der Reagenzien Zym A und Zym B (Abb. 25). Das Enzymsubstrat α -Naphthyl-Caprylat war ausgewählt worden, weil *P. pabuli* M1 in Gegenwart dieser Verbindung eine detektierbare Aktivität gezeigt hatte (Abb. 30). Aus den gemessenen Daten wurden die arithmetischen Mittelwerte der Ansätze 1-20 errechnet und daraus ein gemeinsamer Mittelwert von 0.55 gebildet.

Tab. 7. Ermittlung der lipolytischen Aktivität im Wildtyp von *Paenibacillus pabuli* M1.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte unter Verwendung von α -Naphthyl-Caprylat als Enzymsubstrat zum Zeitpunkt t_{60} (60 Minuten Inkubation).

parallele Messungen	Ansätze									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.48	0.54	0.50	0.52	0.51	0.52	0.52	0.46	0.41	0.50
2	0.48	0.54	0.50	0.52	0.47	0.52	0.51	0.46	0.42	0.49
3	0.50	0.55	0.51	0.53	0.50	0.52	0.57	0.49	0.41	0.52
arithm. Mittel	0.49	0.54	0.50	0.53	0.49	0.52	0.53	0.47	0.41	0.50
parallele Messungen	Ansätze									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0.40	0.56	0.56	0.64	0.64	0.64	0.61	0.64	0.62	0.65
2	0.42	0.56	0.56	0.65	0.64	0.63	0.61	0.64	0.64	0.64
3	0.42	0.56	0.58	0.65	0.63	0.63	0.60	0.62	0.63	0.63
arithm. Mittel	0.41	0.56	0.57	0.65	0.64	0.63	0.61	0.63	0.63	0.63

3.7.6 Vergleich der lipolytischen Aktivität zwischen Wildtyp und mutagenisierten Stämmen

41 unterschiedliche Kolonien, die bereits auf Tributyrin Agar-Platten eine um 150% gesteigerte lipolytische Aktivität gezeigt hatten, wurden mit dem im vorangegangenen Kapitel

beschriebenen Verfahren untersucht (Tab. 8). Sie stammen aus den Ansätzen 18, 19, 26, 27, 34, 35 und waren sowohl nur mit UV-Licht als auch mit einer Kombination aus UV-Strahlung und NTG behandelt worden.

Tab. 8. Bestimmung lipolytischer Aktivität der mutagenisierten Stämme von *P. pabuli* M1.

Die Aktivität wurde unter Verwendung von α -Naphthyl-Caprylat zum Zeitpunkt t_{60} ermittelt.

Ansatz	Mutagenes Agenz	Keimzahlen vor dem Screening [MO/ml]	Kolonien mit vergrößerten Höfen [Bezeichnung]	Lipase-Aktivität 3 parallele Messungen			arithm. Mittel
				[OD _{580 nm}]			[OD _{580 nm}]
18	UV-Strahlung	1.6 x 10 ⁸	18.2.3.1 18.2.4.1	2.02 2.4	2.0 2.1	2.05 2.1	2.02 2.2
19	UV-Strahlung	1.4 x 10 ⁸	19.2.1	2.3	2.32	2.28	2.3
26	UV-Strahlung	1.8 x 10 ⁸	26.2.1 26.2.2	1.8 1.5	1.7 1.4	1.8 1.3	1.8 1.4
27	UV-Strahlung	2.1 x 10 ⁸	27.2.11 27.2.12	2.11 1.5	2.1 1.51	2.11 1.49	2.1 1.5
34	1. UV-Strahlung 2. NTG	1.2 x 10 ⁸	34.1	1.70	1.50	1.6	1.6
			34.2	2.08	2.14	2.15	2.1
			34.3	2.30	2.30	2.30	2.3
			34.4	1.80	1.70	1.80	1.8
			34.5	2.31	2.31	2.33	2.3
			34.6	1.50	1.51	1.60	1.5
			34.7	2.22	2.32	2.28	2.3
			34.8	2.28	2.28	2.27	2.3
			34.9	1.90	1.89	1.85	1.9
			34.10	2.11	2.11	2.16	2.1
			34.11	1.99	1.99	1.97	2.0
			34.12	2.18	2.16	2.16	2.2
			34.13	2.13	2.08	2.08	2.1
			34.14	2.10	2.05	2.05	2.1
			34.15	2.30	2.30	2.30	2.3
			34.16	2.10	2.10	2.10	2.1
			34.17	1.80	1.77	1.75	1.8
35	1. UV-Strahlung 2. NTG	1.8 x 10 ⁸	34.18	2.10	2.15	2.20	2.2
			34.19	2.14	2.17	2.15	2.2
			34.20	2.07	2.02	2.04	2.0
			35.1	1.8	1.79	1.79	1.8
			35.2	1.51	1.61	1.55	1.56
			35.3	2.19	2.2	2.22	2.2
			35.4	2.05	2.14	2.26	2.15
			35.5	1.94	1.93	1.93	1.93
			35.6	2.02	2.02	2.02	2.02
			35.7	2.02	2.05	2.03	2.03
			35.8	2.14	2.12	2.16	2.14
			35.9	2.15	2.11	2.09	2.12
			35.10	2.0	2.05	2.08	2.04
			35.11	2.22	2.09	2.26	2.19
			35.12a	2.14	2.18	2.12	2.15
			35.12b	2.08	2.17	2.14	2.13
			35.13	2.19	2.15	2.17	2.17

Als kleinster Wert für lipolytische Aktivität wurde in den Ansätzen 34 und 27 eine OD von 1.5 ermittelt (Tab. 8). Wird das arithmetische Mittel aus Tab. 7 zugrunde gelegt, weist dieser Wert bereits auf eine dreifache Steigerung der Ausgangsaktivität hin. Die zusätzlich untersuchten Stämme zeigen darüber hinaus Werte, die über einer OD von 1.5 lagen.

Bemerkenswert erscheint in jedem Fall auch die Tatsache, daß alle drei parallelen Messungen nur geringfügig voneinander abweichen. Damit konnte die Beobachtung auf Tributyrin-Platten, daß die vorliegenden mutagenisierten Stämme eine stärkere lipolytische Aktivität exprimieren, durch Aktivitätsmessungen bestätigt werden. Darüber hinaus läßt der Auftrag der arithmetischen Mittelwerte aus Tabelle 7 und 8 erkennen, daß die Streuung der Daten beim Wildtyp deutlich geringer auftritt als bei den mutagenisierten Stämme (Abb. 32).

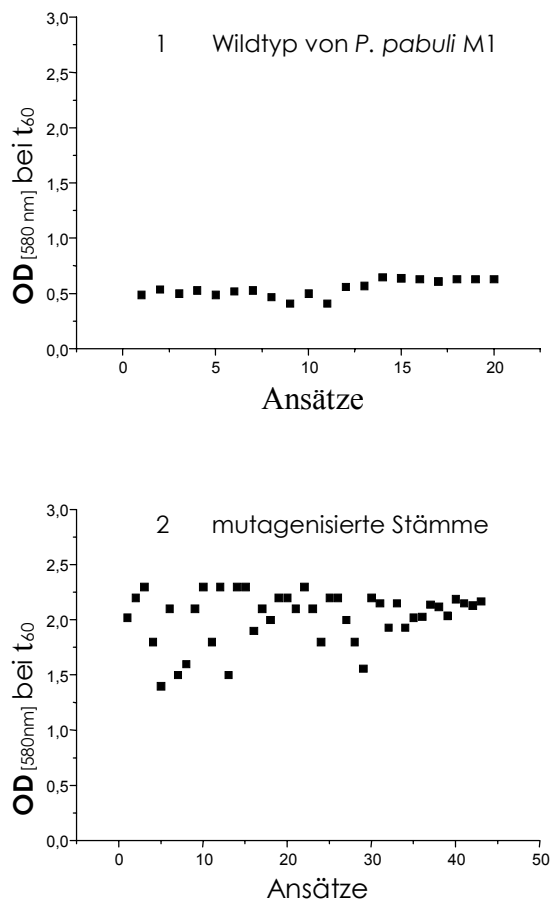


Abb. 32.

Streuung bei Ermittlung lipolytischer Aktivität im Vergleich von Wildtyp und mutagenisierten Stämmen.

Sowohl Wildtyp als auch mutagenisierte Stämme von *P. pabuli* M1 wurden mittels α -N-Caprylat untersucht. Die arithmetischen Mittelwerte (OD_[580nm] bei t₆₀) aus Tab. 7 und 8 wurden für die einzelnen Ansätze aufgetragen.

- 1 Wildtyp von *P. pabuli* M1 (Tab. 7),
- 2 mutagenisierte Stämme (Tab. 8).

3.8 Makrorestriktions-Analyse

Nachdem die vorangegangenen Mutagenisierungsarbeiten eine signifikante Steigerung der lipolytischen Aktivität im Kulturüberstand von *Paenibacillus pabuli* M1 ergeben hatten, sollten diese Mutanten durch Makrorestriktions-Analyse auf das Vorhandensein von chromosomalen Tandem-Duplikationen untersucht werden (2.2.10). Diese Stämme waren zuvor auf Tributyrin Agar-Platten einem Screening unterzogen und dabei waren jene Kolonien isoliert worden, die im Vergleich zu dem Wildtyp deutlich größere Höfe auf dem Medium hervorbrachten. Nachdem auch die exaktere Bestimmung ihrer lipolytischen Aktivität auf biochemischer Ebene zu der gleichen Aussage geführt hatte, sollte die Makrorestriktions-Analyse Aufklärung geben über Veränderungen im Genom dieser Stämme. Dazu war es zunächst notwendig, die Fragmentierung der genomischen DNA durch die Anwendung verschiedener selten-schneidender Restriktions-Endonukleasen (RE) zu testen (Abb. 33).

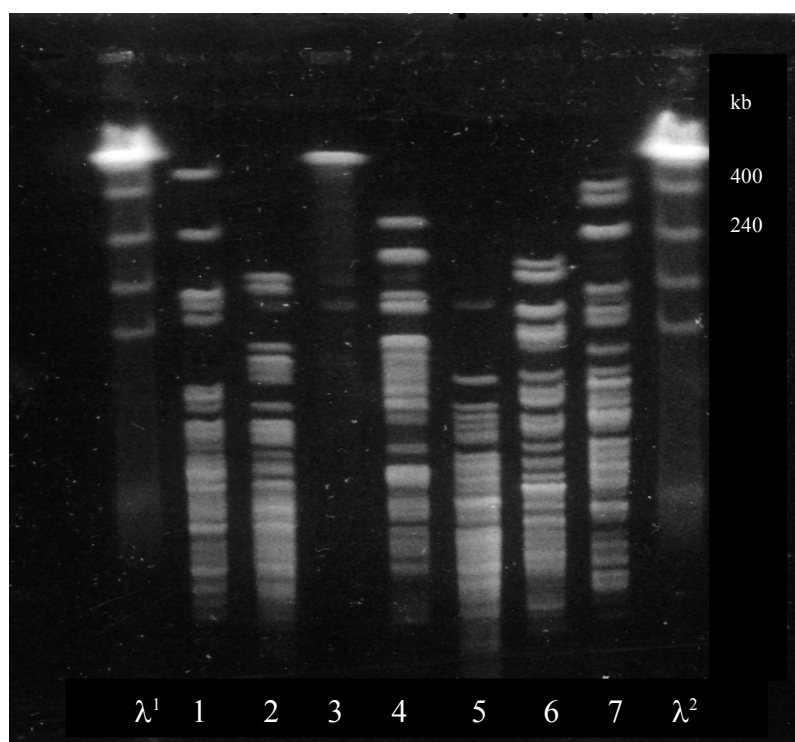


Abb. 33.

Ein Vergleich der Fragmentierung genomischer DNA von *Paenibacillus pabuli* M1.

Der Verdau wurde unter Verwendung verschiedener Restriktions-Endonukleasen durchgeführt. Die Visualisierung der Fragmente erfolgte nach Auftrennung durch PGFE in einem 1%igen Agarose-Gel durch Sybr Green-Färbung und Bestrahlung von UV-Licht einer Wellenlänge von 280 nm.

Spur:	λ^{1+2}	Marker: λ -Ladder,
	1	<i>AscI</i> -Verdau,
	2	<i>NotI</i> -Verdau,
	3	<i>PacI</i> -Verdau,
	4	<i>PmeI</i> -Verdau,
	5	<i>SfiI</i> -Verdau,
	6	<i>SpeI</i> -Verdau,
	7	<i>SwaI</i> -Verdau.

Die Länge der Erkennungssequenzen der Restriktions-Endonuklasen bestimmen die Häufigkeit, in der diese Enzyme die Ziel-DNA schneiden. Eine ganze Reihe Restriktions-Endonukleasen mit Erkennungssequenzen von vier bis zu acht Basen sind kommerziell erhältlich. Die Häufigkeit für das Auftreten einer solchen Sequenz in einem Genom hängt von der Länge, vom GC-Gehalt der DNA und dem Codongebrauch des zu untersuchenden Organismus ab. Liegt der GC-Gehalt eines solchen Organismus um die 50%, wie z.B. bei *Paenibacillus pabuli* M1, geht man davon aus, daß die Erkennungssequenzen aller Restriktions-Endonukleasen in vergleichbarer Häufigkeit auftreten. In einem solchen Fall muß die Eignung einer RE in Hinblick auf ihre Fähigkeit die DNA eines Genoms selten zu schneiden, empirisch ermittelt werden (Abb. 33).

Es wurden zunächst die in der Legende von Abbildung 33 angeführten Enzyme getestet und die entstandenen DNA-Fragmente für 1-35 Sekunden über einen Zeitraum von 22 Stunden in einem 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die erzielten Ergebnisse legten nahe, für den Verdau der chromosomalen DNA in allen folgenden Arbeiten die Restriktions-Endonuklease *SwaI* zu verwenden. Dieses Enzym erkennt eine Sequenz, die aus 8 Basen und den Nukleotiden ATTT/AAAT besteht. Außerdem schneidet sie das untersuchte Genom in ca. 24 Fragmente.

Unter Verwendung eines *SwaI*-verdauten Genoms von *Paenibacillus pabuli* M1 hatte es sich des weiteren als günstig erwiesen, zwei lineare Rampen von 1-25 Sekunden für 15 Stunden und 0.5-10 Sekunden für 12 Stunden anzuwenden. Dabei wurde das CHEF-DR II-System (6 V/cm) so eingestellt, daß die Agarose-Konzentration im Gel 1% betrug und sich 1.6 Liter 0.5 x TBE-Puffer bei 14°C in der Elektrophorese-Kammer befanden.

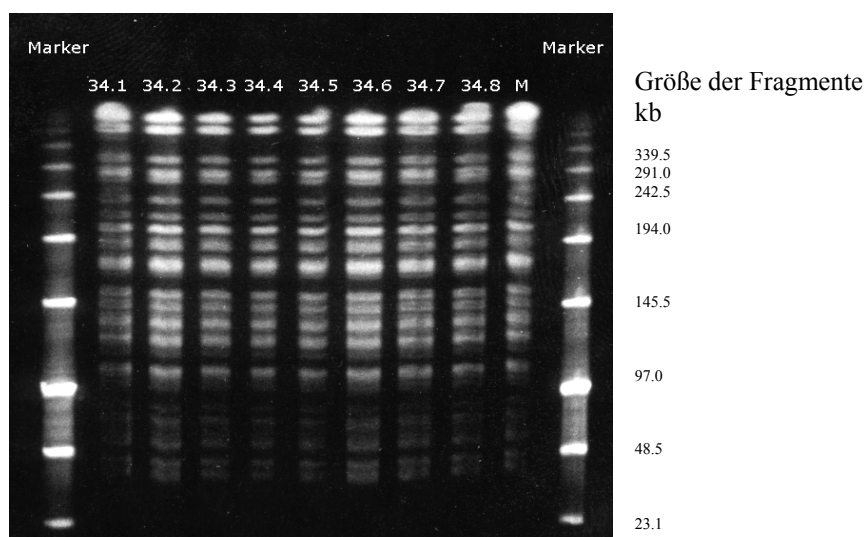


Abb. 34.

***SwaI*-Makrorestriktions-Analyse.**

Der Wildtyp von *Paenibacillus pabuli* M1 wurde mit acht mutagenisierten Stämmen verglichen. Als Längenstandard wurde ein Low Rang PFG-Marker der Firma NE BioLabs benutzt.

M: Wildtyp von *P. pabuli* M1, **34.1-34.8:** mutagenisierte Stämme, die sich durch eine stärkere lipolytische Aktivität auszeichneten (Tab. 8), **Marker:** Low Rang PFG-Marker.

Alle untersuchten Stämme (Tab. 8: 34.1 bis 34.19) zeichneten sich durch eine erhöhte lipolytische Aktivität gegenüber dem Wildtyp aus. Dennoch ließen sich nach einem Verdau mit *SwaI* und anschließender Auftrennung der einzelnen DNA-Fragmente durch PFGE in der vorliegenden Untersuchungsreihe keine Veränderungen auf genomischer Ebene feststellen (Abb. 34).

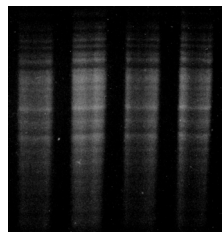
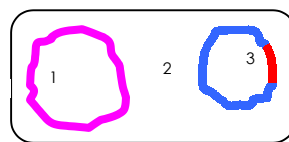
Die Untersuchungen auf chromosomaler Ebene durch die PFGE an dem kompletten Ansatz 34 der Mutagenisierungsarbeiten von *Paenibacillus pabuli* M1 hatten keine neuen Fragmentmuster nachweisen können. Aus diesem Grund wurden 18 weitere mutagenisierte Stämme aus den Ansätzen 35 und 29 mit dem Wildtyp verglichen (Tab. 8). Auch diese Untersuchungen ergaben keine Unterschiede zwischen Wildtyp und mutagenisierten Stämmen.

3.9 Molekularbiologische Untersuchungen an dem Esterase-Gen aus *P. pabuli* M1

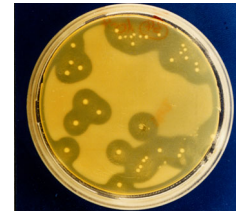
3.9.1 Darstellung des Verfahrensablaufes

Anfertigung einer Genbibliothek

Verdau mit EcoRI

EcoRI-Partialverdau des Genoms von *P. pabuli* M1Transformation
E. coli-ultrakompetente Zellen1 Chromosom
2 Plasmid
3 Insert, unterschiedliche Größen

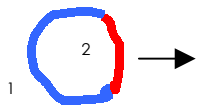
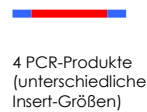
Expressions-Screening



Tributyrin Agar-Platten

Überprüfung der positiven Klone auf identische Gene

8 positive Klone

M13-PCR1 Plasmid
2 Insert, unterschiedliche GrößenHindIII-Verdauin allen vier PCR-Produkten
tauchen identische
Fragmente aufausgeschlossen:

1. *E. coli*-Chromosom
Negativ-Kontrolle bei der Esterase-PCR
2. Plasmid-DNA
Plasmid-Sequenzen auf Primer-Bindungsstellen
untersucht
3. BLAST-Suche
gegen Primer-Sequenzen

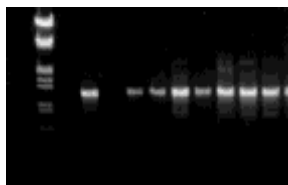
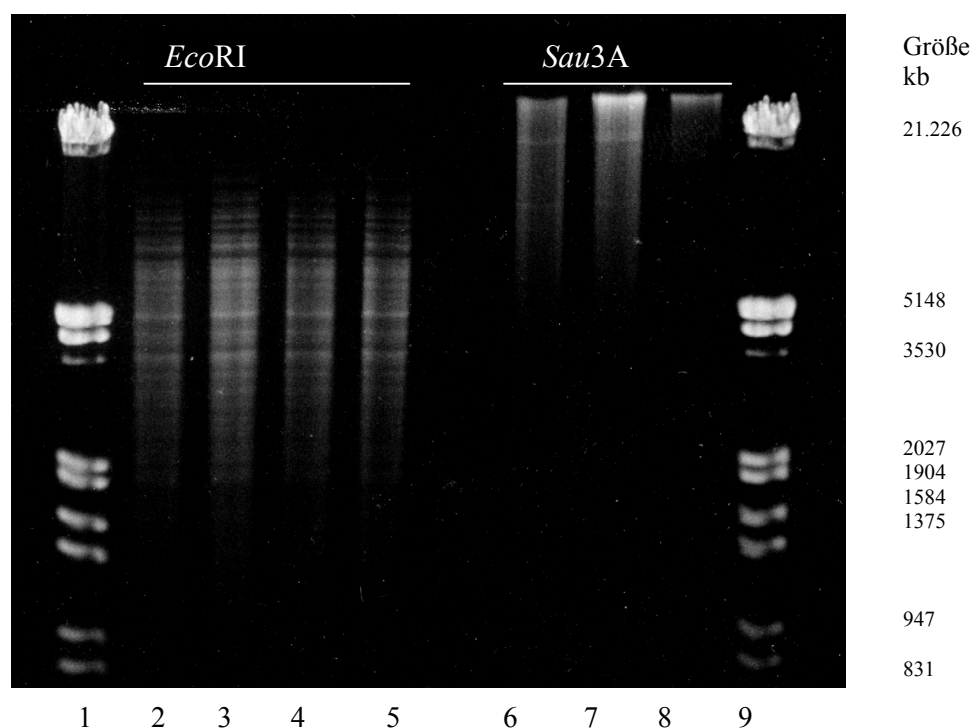
Esterase-PCRvon allen gescreenten 8 positiven
Klonen wurde ein Esterase PCR-
Produkt erhaltenSequenzierung
der Esterase PCR-ProduktePrimer WalkingKlon est27:
1. Sequenzierung des Esterase-GensUntersuchung der MutantenEtablierung
einer Esterase-PCRSequenz-Vergleich
Wildtyp und MutantenAnnotation des Esterase-GensTranslation
in die Aminosäure-
SequenzAnnotation
des Esterase-Gens

Abb. 35 .

Fußdiagramm.Darstellung der molekularbiologischen Untersuchungen an dem Esterase-Gen aus *P. pabuli* M1.

3.9.2 Partialverdau des Genoms von *Paenibacillus pabuli* M1

Auf der Suche nach dem Gen, das die Esterase-Aktivität bei *Paenibacillus pabuli* M1 exprimiert, wurde eine Genbibliothek angefertigt. Aus diesem Grund war es zu Beginn notwendig, eine Restriktions-Endonuklease (RE) zu finden, die nach einem Partialverdau geeignet große Fragmente liefert (2.2.11.2). Es wurden deshalb zunächst die häufig-schneidenden Enzyme *EcoRI* und *Sau3A* getestet (Abb. 36). *Sau3A* erkennt eine Sequenz aus vier (/GATC) und *EcoRI* aus sechs Nukleotiden (G/AATTC).

**Abb. 36.****Partialverdau des Genoms von *Paenibacillus pabuli* M1 durch *EcoRI* und *Sau3A*.**

In jeder Spur wurden 1 µg fragmentierte DNA aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte durch Pulsed-Field-Gelelektrophorese in einem 0.8 prozentigen Agarose-Gel unter Einhaltung eines *Rampings* von 0.1-1.0 Sekunden über einen Zeitraum von 6.5 Stunden bei 14°C. Anschließend wurde eine Färbung mit Ethidiumbromid durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 280 nm.

Spur:	1+9	Marker III (Roche),	Spur:	6	<i>Sau3A</i> , 1 Unit,
	2	<i>EcoRI</i> , 2 Units,		7	<i>Sau3A</i> , 0.5 Units,
	3	<i>EcoRI</i> , 1 Unit,		8	<i>Sau3A</i> , 0.25 Units.
	4	<i>EcoRI</i> , 0.5 Units,			
	5	<i>EcoRI</i> , 0.25 Units,			

Die vorliegenden Ergebnisse führten zu der Entscheidung, die genomische DNA von *P. pabuli* M1 einem Partialverdau durch *EcoRI* mit 0.5 U bei 3 µg eingesetzter DNA zu unterziehen (2.2.11.5).

3.9.3 Herstellung einer Genbibliothek von *P. pabuli* M1

Durch den Partialverdau mit *Eco*RI entstanden Fragmente in einer Größenordnung von 2000 bis 13.000 Basen. Diese liegen innerhalb der Ligationskapazität des verwendeten pBluescript® II SK (+) Phagemid-Vektors, der selbst eine Größe von 2950 Basen besitzt. Ausgehend von 2000 Basen als kleinste Fragmentgröße dürfte dadurch die Länge des gesuchten Gens nicht unterschritten werden. Die hergestellten Konstrukte wurden in ultrakompetente *E. coli*-Zellen des Herstellers *Stratagene* (XL 10-Gold®) transformiert. Sie erlauben die Aufnahme von Konstrukten bis zu einer Größe von 25 kb und zeichnen sich durch das Vorhandensein des *lacI^q ZAM15* Gens auf dem F' Episom aus, das in Gegenwart entsprechender rekombinanter Plasmide das Blue-White Color Screening unterstützt.

3.9.4 Durchmustern der Genbibliothek

Aufgrund der Tatsache, daß von der untersuchten Esterase aus *Paenibacillus pabuli* M1 weder Nukleinsäure- noch Aminosäure-Sequenz bekannt war, erfolgte nach der Transformation ein Expressions-Screening auf Tributyrin Agar-Platten (2.2.12). Bereits im Vorfeld dieser Arbeiten wurden Southern Blot-Hybridisierungen mittels DIG-markierter Oligonukleotidsonden durchgeführt. Diese Sonden wurden unter Verwendung von Alignments bekannter Gene aus *Bacillus subtilis* und *Bacillus pumilus* entwickelt und waren gegen hochkonservierte Bereiche gerichtet. Dabei handelte es sich um 18-20 Basen lange Nukleotid-Sequenzen, die für die katalytischen Zentren der daraus translatierten Enzyme codieren. Ein positiver Nachweis, auch unter stringenten Hybridisierungs-Bedingungen, konnte nicht geführt werden. Aus diesem Grund war es nicht möglich, die hergestellte Genbibliothek mittels DIG-markierter Oligonukleotidsonden auf Dot Blots zu screenen, sondern es wurde darauf zurückgegriffen, die mögliche Expression lipolytischer Aktivität auf Tributyrin Agar-Platten zu führen und die Genbibliothek mit diesem Verfahren durchzumustern. Im Kontrollansatz konnte nachgewiesen werden, daß von nicht transformierten *E. coli*-Zellen und transformierten Organismen, die das Plasmid ohne Insert aufgenommen hatten, keine Esterase-positive Reaktion ausging.

Die genaue Genomgröße von *Paenibacillus pabuli* M1 ist bislang noch nicht bekannt. Genome taxonomisch relativ nahe verwandter Organismen wie *Bacillus subtilis* und *Bacillus cereus* erreichen eine Größe von 4.2×10^6 Basen und 5.4×10^6 Basen. Der unter Verwendung von *Eco*RI durchgeführte Partialverdau lieferte Fragmente in einer Größe zwischen 2000 und 13.000 Basen. Man kann also im Mittel von einem Genom einer Größe von 4.5×10^6 Basen

und einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 5500 Basen ausgehen. Dann ermittelt sich die Anzahl unabhängiger Klone N, die gescreent werden müssen, um das gesuchte Gen mit 99.9%iger Wahrscheinlichkeit zu finden, nach folgender Formel (Sambrook und Russell, 2001):

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-(F/G))}$$

P= 0.999 (Wahrscheinlichkeit)

F= 5500 (mittlere Länge eines klonierten Fragmentes in bp)

G= 4.5×10^6 Basen (geschätzte Genomgröße von *Paenibacillus pabuli* M1)

N= Anzahl unabhängiger Klone

Die Zahl N der zu plattierenden Klone beträgt demnach theoretisch ca. 5650, um mindestens einen positiven zu screenen. Tatsächlich wurden ca. 10.000 Klone durchgemustert und 8 gefunden, bei denen das gesuchte Merkmal exprimiert wurde.

3.9.5 M13-PCR

Von allen acht Klonen, die auf Tributyrin Agar-Platten eine positive Esterase-Reaktion gezeigt hatten, erfolgte eine Präparation der Plasmid-DNA mit einer sich anschließenden M13-PCR (Abb. 37 und 2.2.13.4).

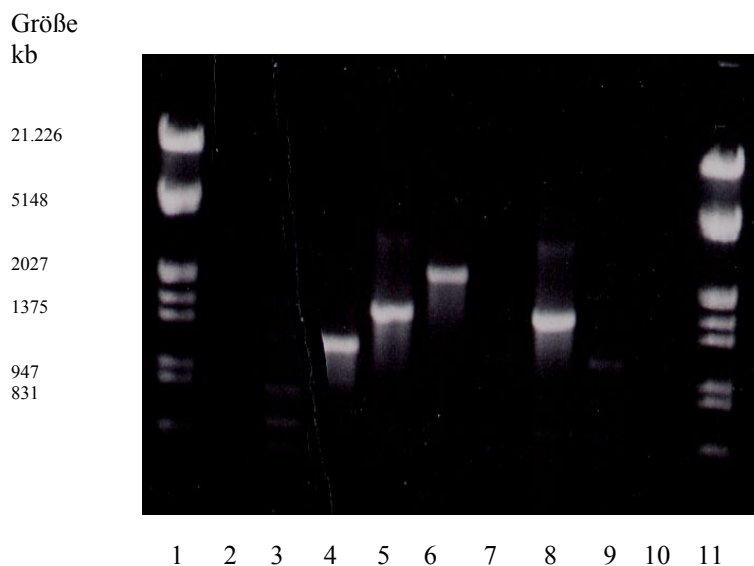


Abb. 37.

Amplifikation der klonierten Inserts durch M13-PCR.

Nach einem erfolgreichen Screening auf Tributyrin-Platten wurden von allen acht positiven Klonen eine M13-PCR durchgeführt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1%igem Agarose-Gel bei 100 Volt und einer Laufzeit von 30 Minuten (Ethidiumbromidfärbung).

Spur:	1+11	Marker III (Roche),	Spur:	6	Klon est29,
	2	Negativ-Kontrolle,		7	Klon est50.10,
	3	Klon est11,		8	Klon est50.19,
	4	Klon est20,		9	Klon est50.32,
	5	Klon est27,		10	Klon est50.40.

Der pBluescript® II SK (+) Phagemid-Vektor ist so konstruiert, daß er eine multiple Klonierungssequenz mit Schnittstellen für unterschiedliche Restriktions-Endonukleasen, u.a. auch für *EcoRI*, aufweist. Sie wird flankiert durch Bindungssequenzen für die universellen M13-Primer (Tab. 1). Dadurch ließen sich die klonierten Inserts mit unbekannter DNA-Sequenz amplifizieren. Allerdings lieferte die M13-PCR nur von 4 der insgesamt 8 Esterase-positiven Klone ein Produkt (Abb. 37: est20, est27, est29 und est50.19). Eine Auftrennung in einem 1%igen Agarose-Gel ließ erkennen, daß die gebildeten PCR-Produkte Größen zwischen 1.2 und 2.1 kb aufwiesen. Die durch M13-PCR entstandenen Amplifikate setzen sich aus dem ligierten Insert und zu beiden Seiten davon jeweils aus 100 Basen zusammen, die vom verwendeten Plasmid stammen und zwischen der M13-Bindungsstelle und der Schnittstelle für die verwendete *EcoRI*-Endonuklease liegen. Demnach wies Klon est27 eine Insert-Größe von 1.4 kb auf. Die DNA dieses Klonen wurde anschließend durch ein sogenanntes *Primer Walking* sequenziert und lieferte die Rohsequenz des gesuchten Gens (2.2.13.5).

3.9.6 *HindIII*-Verdau der M13-PCR-Produkte

Von allen vier M13-PCR-Produkten (Abb. 37) wurde anschließend ein Verdau mit der häufig-schneidenden Restriktions-Endonuklease *HindIII* durchgeführt. Dieses Enzym erkennt eine Sequenz aus den sechs Nukleotiden A/AGCTT. Ausgehend von diesem Versuchsaufbau sollte die Frage beantwortet werden, ob die klonierten Inserts, die zuvor durch M13-PCR amplifiziert worden waren und sich beim Screening auf Tributyrin Agar-Platten für die Expression einer positiven Esterase-Reaktion verantwortlich gezeigt hatten, möglicherweise identische Gene aufwiesen.

Dazu wurden die amplifizierten vier PCR-Produkte durch Verwendung eines Prep-A-Gene Purification Kits aufgereinigt (2.1.7). Für den Verdau in einem 50 µl Reaktionsvolumen wurden 0.7 Unit *HindIII* und ca. 0.7 µg DNA, insgesamt, eingesetzt. Alle weiteren Bedingungen folgten den Angaben des Herstellers (NE BioLabs) und den Angaben unter 2.2.11.2. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde die Reaktion durch Erhitzen bei 65°C für 20 Minuten gestoppt. Theoretisch sollten sich die vorliegenden M13-PCR-Produkte, wie bereits erwähnt, aus zwei je 100 Basen langen Sequenzen des verwendeten pBluescript® II SK (+) Phagemid-Vektors zusammensetzen, die zu beiden Seiten ein Insert unterschiedlicher Größe flankieren.

Der Verdau mit *HindIII* ergab einen ersten Hinweis darauf, daß die vier vorliegenden Esterase-positiven Klone, die ein unterschiedlich großes Insert aufgenommen hatten, identische Esterase-Gene aufweisen konnten. Dafür sprach die Tatsache, daß nach einer Elektrophorese der entstandenen Fragmente in einem 1%igen Agarose-Gel bei 100 Volt über einen Zeitraum von ca. 30 Minuten bei allen vier verdauten M13-PCR-Produkten mindestens drei identische Fragmente auftraten. Dieser Umstand wurde als ein indirekter, aber deutlicher Hinweis gewertet, daß die Genbibliothek, die zuvor von *Paenibacillus pabuli* M1 angefertigt worden war, *ein identisches* Esterase-Gen gescreent hatte.

3.9.7 Esterase-PCR der positiven Klone

Ausgehend von dieser Annahme wurde von allen insgesamt acht ursprünglichen Esterase-positiven Klonen DNA präpariert (3.9.1). [Mittels M13-PCR hatten damit lediglich vier Amplifikate hergestellt werden können (Abb. 38)]. Diese DNA wurde nun mittels Esterase-PCR (2.2.14) amplifiziert und lieferte in allen acht Fällen ein PCR-Produkt. Die verwendeten Primer waren für das Esterase-Gen in Klon est27 entwickelt worden (Tab. 1). Als Positivkontrolle diente hierbei die DNA von *Paenibacillus pabuli* M1, während die verwendeten ultrakompetenten *E. coli*-Zellen als Negativkontrolle eingesetzt wurden. Des weiteren wurde im Vorfeld der Untersuchungen die 2950 Basen lange Nukleinsäure-Sequenz des verwendeten pBluescript® II SK (+) Phagemid-Vektors auf mögliche Bindungsstellen für die eingesetzten Primer untersucht (Tab. 1: PPest-PCR-F und PPest-PCR-R). Nachdem keine entsprechenden Sequenzen gefunden worden waren und auch eine BLAST-Analyse (Basic Local Alignment Tool unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> des NCBI-National Center for Biotechnology Information) eine Zuordnung der verwendeten Primersequenzen zu einem weiteren bakteriellen Gen ausgeschlossen hatte, konnte mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, das alle acht exprimierten Genprodukte mit positiver Esterase-Aktivität auf *identische* Gene zurückzuführen waren. Alle vorliegenden Esterase PCR-Produkte wurden anschließend mittels eines Primers (Tab. 1: PPest-PCR-F) über eine Länge von ca. 360 Basen sequenziert und gegen die entsprechende Sequenz des Esterase-Gens aus *Paenibacillus pabuli* M1 verglichen (Anhang, Abb. A11). Dabei erwiesen sich alle analysierten Positionen als identisch.

Esterase-PCR

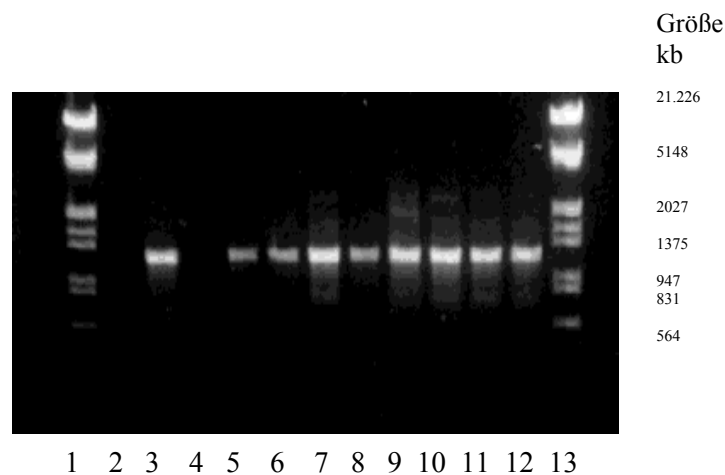


Abb. 38.

Esterase-PCR der acht gescreenten positiven Klone aus der Genbibliothek von *Paenibacillus pabuli* M1.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarose-Gel bei 100 Volt und einer Laufzeit von ca. 30 Minuten aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte nach einer Färbung mit Ethidiumbromid durch Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 280 nm.

Spur:	1+13	Marker III (Roche),	6	Klon est20,
	2	Negativkontrolle,	7	Klon est27,
	3	<i>Paenibacillus pabuli</i> M1,	8	Klon est29,
	4	<i>E. coli</i> : Für die Klonierung	9	Klon est50.12,
		verwendete kompetente Zellen,	10	Klon est50.32,
	5	Klon est11,	11	Klon est50.40.

3.9.8 Translation der Aminosäure- aus der Nukleinsäuresequenz

```

      -35                -10
TGATGGTGGTCTTTTGAATGCGATTGGTCGTATATTAATAGTATGC

1  ATGGATTTTAAACCGCTTGCTTCATTTATCGACCGCATCACTGCT
   M D F K P L A S F I D R I T A 15
46  TGGCGTGTTCGGTGGGCGGAAGTACTTGTTCATGCATCGCAACGAA
   W R V P W A E V L V M H R N E 30
91  ACGGTTTTCGGTTATCGCAACGGCTTTGCTAATTTGGAAGAGCAA
   T V F R Y R N G F A N L E E Q 45
136 ACGCCCATCGGCGAAGGCGGATCATCAACTTGTA
```

Abb. 39.

Nukleinsäure (schwarz)- und translatierte Aminosäuresequenz (grau) des Esterase-Gens aus *Paenibacillus pabuli* M1.

Erklärung: siehe Abb. 39. Fortsetzung.

```

271   GCCGAGATGACGGTCAGAAAAACTTTGCCGAACGGGGAAGTGC GG
      A E M T V R K T L P N G E V R   105
316   CTGGAGAAAGCGACAAAAGCCATTACGGTGCGCGACCTGTTTACG
      L E K A T K A I T V R D L F T   120
361   ATGACGGCCGGATTTTCCTATGACGTTGGAGCACCATCTATCCAG
      M T A G F S Y D V G A P S I Q   135
406   GAGGCCGTGAAGAGCACGAACGGCACGTTGTCGACGCGTGAATTT
      E A V K S T N G T L S T R E F   150
451   GCGAAGGCGCTTGCGAAAGAGCCGCTGCTGTTTCGAGCCCGGGACG
      A K A L A K E P L L F E P G T   165
496   CAGTGAATTACAGCATGTGCCACGATGTGCTTGGCGCTTTGATT
      Q W N Y S M C H D V L G A L I   180
541   GAAGTCGTGGATGGCAGACGGTTCGGCACATACTTAAAAGAGGAA
      E V V D G R R F G T Y L K E E   195
586   ATCACCGACCCGCTCGGCATGCACGATACGGCATTGACCTGAAT
      I T D P L G M H D T A F D L N   210
631   GACGAGCAGCAGGCCAGATTGATCCCGCAGTATGCGTACAATGAC
      D E Q Q A R L I P Q Y A Y N D   225
676   GAGCTTGGCAAAGCCGTTTCGCATGGACGGCAACGGTTTCCGGGTA
      E L G K A V R M D G N G F R V   240
721   CGGCACGGCGCTGGAAACGGAGGCGCAGGATTGTTGTCTACCGTC
      R H G A G N G G A G L L S T V   255
766   AGCGATTACGCGCTGTTCTGAATGCATTGACTGGGCGCGGCACA
      S D Y A L F L N A L T G R G T   270
811   AGCCCGGACGGCGTGCGCATCTTGTCACAGGCTTCGGTCGAACTG
      S P D G V R I L S Q A S V E L   285
856   ATGCGTACGGACCATCTGAATGATTGACCCGAGGCGACTACTCC
      M R T D H L N D L T R G D Y S   300
901   TGGGATCAAATGAAAGGCTACGGCTACGGGTTAGGCGTACGGACC
      W D Q M K G Y G Y G L G V R T   315
946   CATGTCTCCAAGGCCGGCAGCGGCTCCTTGAGTCCGCTGGGCGAG
      H V S K A G S G S L S P L G E   330
991   TTCGGCTGGAGCGGCGCTGCCGGCTGCATGGCCATCATCGATCCG
      F G W S G A A G C M A I I D P   345
1036  GATTCCGAACTTACGGTTATGTATGCGCAGCACCTGTTGAACAGT
      D S E L T V M Y A Q H L L N S   360
1081  CAGGAGCCGTACATCCAGCCTCGCTTGAGAAATATCGTTTACGCC
      Q E P Y I Q P R L R N I V Y A   375
1126  TGCTTATAG
      C L *                               378

```

Abb. 39. Fortsetzung.

Nukleinsäure (schwarz)- und translatierte Aminosäuresequenz (grau) des Esterase-Gens aus *Paenibacillus pabuli* M1. Die Consensus Regionen (-10 und -35) sind blau dargestellt, während das Start-Codon in grün wiedergegeben wurde. Das vermutliche Stop-Codon wurde in roter Schrift markiert und das vermutete katalytische Zentrum ist in kursiver roter Schrift, unterstrichen, kenntlich gemacht. Das für membrangebundene Enzyme charakteristische Tripeptid RGD ist grau unterlegt dargestellt.

3.9.9 BLAST-Analyse

Die Primärsequenz des Inserts aus dem positiven Klon est27 wurde zunächst durch die Internet-Programme *Open Reading Frame Finder* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>] und *geneMark* [<http://www.ebi.ac.uk/genemark/>] auf mögliche Open Reading Frames (OPFs) untersucht. Dabei wurden alle sechs translatierbaren Varianten berücksichtigt. Unter Verwendung des bakteriellen *Codon Usage* wurde ein Open Reading Frame von 1134

Nukleotiden festgestellt und durch eine BLAST-Analyse (Basic Local Alignment Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) des NCBI-National Center for Biotechnology Information mit Aminosäure-Sequenzen anderer Gene verglichen. Dabei erzielte ein hypothetisches konserviertes Protein aus *Caulobacter crescentus*, einem Angehörigen der α -Proteobakterien, die höchste Trefferquote mit 183 Bits und einem E-Wert von $3e-45$, 36 Prozent identischer und 53 Prozent ähnlicher Aminosäuren. Auch die fünf nächstverwandten Proteine aus der Datenbank waren nicht näher charakterisiert. Eine Transesterase aus *Mycobacterium tuberculosis*, einem hoch GC-reichen Gram-positiven Organismus erreichte an siebter Stelle eine Trefferquote von 146 Bits und einen E-Wert von $4e-34$ und stellte das erste klassifizierte Enzym in der Datenbank dar mit dem die Esterase aus *Paenibacillus pabuli* M1 einen signifikanten Verwandtschaftsgrad aufwies. Ein Alignment beider Aminosäuresequenzen ergab 31 Prozent identischer und 46 Prozent ähnlicher Aminosäuren (Abb. 41). An 10. und 12. Position folgen eine 1,4-Butandiol Diacrylat-Esterase aus *Brevibacterium linens* (128 Bits, $1e-28$, 26 Prozent identische und 40 Prozent positive Aminosäuren) und eine Dfp-inhibierte Esterase aus *Burgholderia gladioli* (113 Bits, $5e-24$, 27 Prozent identische und 43 Prozent positive Aminosäuren) sowie an Position 15 eine Transesterase aus *Aspergillus terreus* (89 Bits, $7e-17$, 29 Prozent identische und 45 Prozent positive Aminosäuren). Diese Werte sind nicht als statisch zu betrachten, sondern hängen auch von den Einträgen in der Datenbank ab.

Diese Sequenzähnlichkeiten wurden als ein weiterer Hinweis darauf gewertet, daß es sich bei dem gesuchten Gen und dem entsprechenden Genprodukt nicht um eine Lipase sondern um eine Esterase handelt. Die BLAST-Analyse ließ demnach eine Verwandtschaft zu Aminosäure-Sequenzen von Genen erkennen, die im vermuteten katalytischen Zentrum das konservierte Motiv S-X-X-K aufweisen und in die von Jaeger *et al.* (1999) charakterisierte Familie VIII gehören. Vertreter dieser Enzymfamilie weisen darüber hinaus erhebliche Ähnlichkeit zu β -Lactamasen der Klasse C auf und es ist möglicherweise von einer paralogen phylogenetischen Beziehung zwischen den genannten Enzymen auszugehen. Die durchgeführte BLAST-Analyse konnte diese Beobachtung bestätigen. Es befanden sich z.B. auf Position 16 ein β -Lactamase Precursor aus *Pyrococcus abyssi* mit einer Trefferquote von 88 Bits, einem E-Wert von $2e-16$ sowie 25 Prozent identischer und 43 Prozent positiver Aminosäure-Übereinstimmung.

3.9.10 Annotation des sequenzierten Gens

Die Nukleinsäure-Sequenz des gesuchten Gens wurde auf eine Länge von 1134 Basen

festgelegt und beginnt mit einem ATG-Start Codon an Position +1 (Abb. 39). Sie endet mit einem TAG-Stop Codon an Position +1134. Das daraus abgeleitete Protein setzt sich aus 377 Aminosäuren zusammen und weist ein errechnetes Molekulargewicht von 41.659 Dalton auf. Der errechnete isoelektrische Punkt pI liegt bei 5.37.

Die Promotorelemente -35 (TTGAAT) und -10 (TAGTAT) wurden an den Positionen -33 mit einer Matrix Similarity von 86.31% und an Position -8 mit 83.42% gefunden und weisen einen Spacerbereich von 19 Basen auf (Abb. 40). Darüber hinaus wurde durch das PRODORIC Matrix Search Programm der TU Braunschweig ein weiterer -10 Consensus Bereich gefunden (TATATT). Dieser wies eine noch höhere Matrix Similarity von 93.19% auf und befindet sich an Position -22. Hierzu konnte allerdings keine -35 Consensus Region ermittelt werden. Ein Vergleich der -35 und -10-Elemente sowie des Spacerbereichs zwischen dem starken *recA*-Promotor aus *E. coli* und den festgelegten Promotorsequenzen aus *P. pabuli* M1 lassen an 12 analysierten Positionen acht Übereinstimmungen und vier Unterschiede erkennen. Aufgrund der deutlichen Anzahl unterschiedlicher Positionen kann davon ausgegangen werden, daß das Esterase-Gen aus *P. pabuli* M1 unter der Kontrolle eines vermutlich relativ schwachen Promotors steht.

Durch die Internet-Programme MITRA (<http://www.cs.columbia.edu/compbio/mitra/>) und SignalP,V 1.1 wurde die vorliegende DNA-Sequenz und die daraus abgeleitete Aminosäure-Sequenz auf das Vorkommen möglicher Signal-Peptide untersucht. Beide Programme konnten keine Signalpeptide festlegen.

Des weiteren wurde der Upstream-Bereich nach einer Ribosom Binding Site (RBS), einer Shine Dalgarno-Box, untersucht. Diese weist in der Regel einen 7mer Consensus Bereich (TAGGAG) auf und aus diesem leitet sich eine zentrale sehr konservierte Subsequenz AGGA ab (Kibler und Hampson, 2001). Beide Sequenzabschnitte (TAGGAG und AGGA) konnten im Upstream-Bereich des Esterase Gens von *Paenibacillus pabuli* M1 nicht nachgewiesen werden.

<i>E. coli</i>	TTGATA-----17+/-1-----TATAAT
<i>P. pabuli</i> M1	TTGAAT-----19-----TAGTAT

Abb. 40.

Alignment von Consensus Sequenzen (-35 und -10 sowie des Spacerbereichs) von einem starken Promotor aus *E. coli* (*recA*) und dem Promotor des Esterase-Gens aus *P. pabuli* M1.

3.9.12 Vergleich der Nukleinsäuresequenzen zwischen dem Wildtyp von *P. pabuli* M1 und den hergestellten Mutanten

Aus der bekannten Nukleinsäuresequenz des nunmehr vorliegenden Esterase-Gens von *Paenibacillus pabuli* M1 wurden PCR-Primer abgeleitet (Tab. 1: PP-est-PCR-F und PP-est-PCR-R). Unter Verwendung dieser Primer wurde eine Esterase-PCR mit fünf mutagenisierten Stämmen durchgeführt (Tab. 7: 34.7; 34.8; 34.16; 35.3 und 35.7). Die PCR-Produkte wiesen die erwartete Größe von ca. 1200 Basen auf und wurden anschließend sequenziert (Abb. 42, 2.2.13.6 und Tab. 1: PP-est-PCR-F, PPest512F und PPest837F).

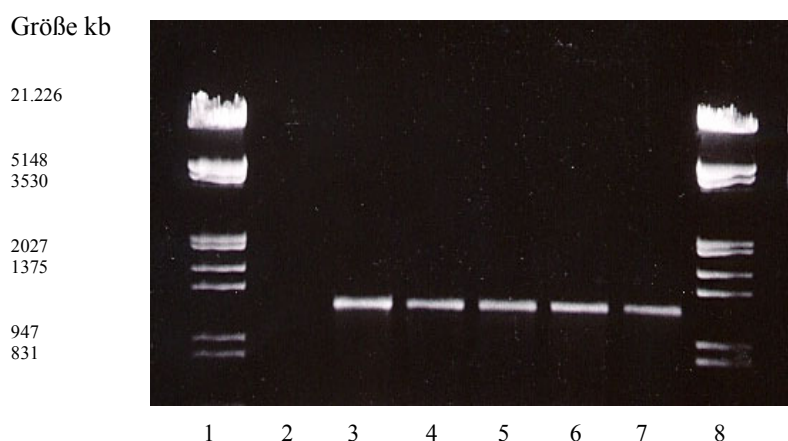


Abb. 42.

Esterase-PCR der mutagenisierten Stämme von *Paenibacillus pabuli* M1.

Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarose-Gel unter Einhaltung von 80 Volt und einer Laufzeit von 30 Minuten aufgetrennt (Ethidiumbromid-Färbung).

Spur:	1+8	Marker III (Roche),
	2	Negativ-Kontrolle,
	3	Mutante 34.7,
	4	Mutante 34.8,
	5	Mutante 34.16,
	6	Mutante 35.3,
	7	Mutante 35.7.

Ein Alignment dieser Nukleinsäuresequenzen mit denen aus dem Wildtyp von *Paenibacillus pabuli* M1 findet sich im Anhang unter Abb. A9. Demnach sind keine Mutationsereignisse in den untersuchten Esterase-Genen zu erkennen.

4. Diskussion

4.1 Aerobe Aufnahme und Verwertung von Fettsäuren durch *Paenibacillus pabuli* M1

Eine große Anzahl von Untersuchungen zur Aufnahme und Verwertung von Fettsäuren innerhalb bakterieller Systeme wurden an *Escherichia coli*, einem Gram-negativen Angehörigen der Familie *Enterobacteriaceae*, vorgenommen. Darüber hinaus konnte auch bei einer weiteren Anzahl Mikroorganismen eine direkte Verwertung von Fettsäuren nachgewiesen werden (Kumar und Black, 1991). Insbesondere eukaryontische Hefezellen waren diesbezüglich Objekt zahlreicher Untersuchungen, während Gram-positive Organismen bisher kaum Berücksichtigung fanden.

Bei *Saccharomyces cerevisiae* wurde beobachtet, daß die Aufnahme von Fettsäuren sowohl durch *einfache* oder *passive* Diffusion als auch durch eine *erleichterte Diffusion* stattfinden kann (Kohlwein und Paltauf, 1983). Darüber hinaus existiert auch noch ein *aktiver Transportmechanismus* in die Zelle.

Als *einfache* oder *passive* Diffusion bezeichnet man einen Vorgang der Aufnahme in die Bakterienzelle, der das unspezifische Eindringen von Stoffen beschreibt. Wesentlich für diese Form des Transportes sind Molekülgröße und lipophile Eigenschaften (Schlegel, 1992).

Die *erleichterte Diffusion* stellt dagegen einen gesteuerten Prozeß dar, bei dem der in der Nährlösung enthaltene Stoff entlang seines Konzentrationsgradienten in die Zelle transportiert wird (Schlegel, 1992). Dieser Vorgang wird durch eine *substratspezifische Permease* katalysiert und ist unabhängig von der Stoffwechselenergie der Zelle. Dabei ist die Transportgeschwindigkeit in einem weiten Bereich von der Substratkonzentration außerhalb der Zelle abhängig. Es wurde außerdem beobachtet, daß die Nährstoffe dabei nicht gegen diesen Konzentrationsgradienten in der Zelle angehäuft werden können.

In Bakterien wurde zudem die Aufnahme von Fettsäuren durch einen *aktiven Transportmechanismus* (Kumar und Black, 1991) beschrieben. Genetische und biochemische Studien an *Escherichia coli* ergaben, daß zwei Proteine an dieser Aufnahme von Fettsäuren beteiligt sind. Das ist zum einen die membrangebundene Acyl CoA-Synthetase. Dieses Enzym zeichnet sich durch eine breite Spezifität für C₇ bis C₁₈ Fettsäuren aus (Finnerty, 1989) und katalysiert unter Bildung eines Thioesters die kovalente Bindung der Carbonsäuren an die HS-Gruppe im Coenzym A. Die Energie, die für diese Reaktion notwendig ist, wird durch die Spaltung von ATP zu AMP+PP_i bereitgestellt. Zum anderen ist an dem *aktiven Transport* durch

die Cytoplasma-Membran ein 33.000 Dalton großes Protein namens FadL (Fatty acid degradation) beteiligt. Dieses Molekül ist für den Transport von langkettigen Fettsäuren, die eine Kohlenstoffkettenlänge zwischen C₁₂ und C₁₈ aufweisen, von essentieller Bedeutung (Black *et al.*, 1985). Dabei codiert der Genbereich *fadL* für das Membranprotein FadL und eingehende Expressionsstudien konnten zeigen, daß nach erfolgter Transformation dieser Plasmid-klonierte Genabschnitt bei den entsprechenden Organismen einen 2-3fach gesteigerten Transport von Fettsäuren durch die Cytoplasma-Membran zur Folge hatte.

Nach Nunn *et al.* (1986) werden in *E. coli* K12-Zellen lang- und mittelkettige Fettsäuren an der Außenseite der Cytoplasma-Membran durch das FadL-Molekül absorbiert und passieren auf unidirektionalem Weg diese Membran. Anschließend unterliegen sie einer Aktivierung durch die Acyl CoA-Synthetase und werden in einem nächsten Schritt durch β -Oxidation metabolisiert.

Setzt man dieses Transportsystem und die Ergebnisse von Banchio und Gramajo (1997) an dem Gram-positiven Organismus *Streptomyces coelicolor* voraus und betrachtet gleichzeitig die Anpassung beider Enzyme an ein bestimmtes Spektrum von Fettsäuren, so läßt sich schlußfolgern, daß der *aktive Transport* in Abhängigkeit von z.B. Glucose im Medium stattfindet und sich auf Fettsäuren einer Kettenlängen zwischen C₁₂ bis C₁₈ beschränkt, während die *erleichterte Diffusion* durch eine Permease katalysiert wird und sich eher auf kurzkettige, ungeladene Moleküle bezieht. Beiden Prozessen schließt sich die Bindung der Fettsäuren an die Acyl CoA-Synthetase an, die anschließend in aktivierter Form vorliegen und durch β -Oxidation metabolisiert werden können.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen setzten in jedem Ansatz identische Fettsäure-Konzentrationen im Medium voraus, so daß von vergleichbaren Stoffgradienten auszugehen ist. Die *erleichterte Diffusion* wird im wesentlichen u.a. von diesem Faktor beeinflusst.

Bei der gaschromatographischen Untersuchung des aeroben Abbaus von kurz- und mittelkettigen Fettsäuren zwischen C₄ bis C₁₀ konnte eine Abnahme von sowohl Caprylsäure als auch Decansäure in Form von Na-Salzen nachgewiesen werden (Abb. 6), während diese Verbindungen als freie Säuren keiner Verwertung unterlagen. Auch deutete sich in Gegenwart von Na-Butyrat und -Capronat eine leichte Abnahme im Vergleich zu den Kontrollen an. Theoretisch könnte eine Aufnahme dieser kurz- bis mittelkettigen Fettsäuren in die Zellen auf einen passiven Transportmechanismus, die *erleichterte Diffusion*, zurückgeführt werden, der keinen Energieeinsatz notwendig macht, es aber erfordert, daß die Fettsäure-Moleküle in

nichtgeladener Form die Membran passieren. Als freie, geladene Säuren und in Gegenwart von Glucose unterlagen diese Fettsäure-Verbindungen keiner Verwertung. Besonders hervorzuheben ist in jedem Fall die Tatsache, daß vor allem Butter-, Capron-, Capryl- und Dekansäure von der vermutlich membrangebundenen Esterase des untersuchten Organismus bevorzugt aus Triglyceriden gespalten werden, sich auf diese Weise entweder außerhalb der Zelle oder im periplasmatischen Raum anhäufen (Abb. 30) und anschließend als Natrium-Salze die Cytoplasma-Membran passieren können. Es kann also als relativ sicher betrachtet werden, daß eine Spezialisierung von *Paenibacillus pabuli* M1 für die genannten Fettsäuren vorliegt. Ausschließlich Myristinsäure (C14:0) wird von dem Organismus unter Energieverbrauch durch die Cytoplasma-Membran transportiert (Abb. 5).

4.2 Dünnschicht-chromatographische Untersuchungen an natürlichen Fetten

Die meisten natürlichen Lipidgemische enthalten Substanzen sehr unterschiedlicher Polarität. So ist es oft schwierig, vollständige Trennungen nach Verbindungsklassen in einem einzigen Fließmittel zu erreichen (Stahl, 1967). Die Triglyceride langkettiger Fettsäuren bilden den Hauptbestandteil der Fette und Öle. Damit stellen sie die natürlichen Fette im engeren Sinne dar. Als Hydrolyseprodukte dieser neutralen Lipide treten Mono- und Diglyceride sowie freie Fettsäuren und das wasserlösliche Glycerin auf.

Die Herstellung von Rhodamin B-Platten machte es notwendig, die eingesetzten Fette einem Säulen-chromatographischen Reinigungsverfahren zu unterziehen. Dieses sollte ein Vorliegen von ausschließlich Triglyceriden in dem zur Herstellung des Mediums verwendeten Fett gewährleisten. Alle Hydrolyseprodukte der neutralen Lipide mußten notwendigerweise ausgeschlossen werden. Ein visueller Vergleich der Laufeigenschaften der untersuchten Verbindungen auf Dünnschicht-Platten und deren R_F -Werte ließ erkennen (Abb. 8-16 und Tab. 3), daß die verwendete Aluminiumoxidsäule tatsächlich eine Separation der Triglyceride von allen weiteren Hydrolyse-Produkten gewährleistete und es sich bei den im Fett verbleibenden Bestandteilen um die gereinigt vorliegende Triglyceridkomponente handelte. In dieser Form war es möglich, das Pflanzenöl und auch das Kokosfett für die Herstellung von Rhodamin B-Platten zu verwenden.

4.3 Mikrobiologischer Nachweis lipolytischer Aktivität

Auf der Suche nach einem geeigneten Screening-Verfahren für die mutagenisierten Organismen wurden verschiedene physiologische Tests im Hinblick auf ihre Eignung untersucht, einen sowohl qualitativen als auch quantitativen Hinweis auf das Vorhandensein extrazellulärer lipolytischer Enzyme zu liefern.

4.3.1 Tween-Medium

Der Nachweis lipolytischer Aktivität wurde auf Tween 80- (Sorbitan-Ölsäure, C18:1) Tween 20- (Sorbitan-Laurylsäure, C12:0), Tween 40- (Sorbitan-Palmitinsäure, C16:0) und Tween 60-Platten (Sorbitan-Stearinsäure, C18:0) geführt. Tweens stellen Polyoxyalkylen-Derivate des Sorbitans dar, die mit Fettsäuren einer definierten Kettenlänge über eine Esterbindung verknüpft sind.

Üblicherweise gilt die Hydrolyse von Tween 80 als eines von vielen Merkmalen (Sierra, 1957), das im Rahmen physiologisch-taxonomischer Untersuchungen erhoben wird. Unabhängig davon wird dieses Merkmal auch benutzt, um das Vorhandensein extrazellulärer lipolytischer Aktivität zu bewerten. Tween-Verbindungen können als ein Modellsystem für die Darstellung lipolytischer Aktivität betrachtet werden weil sie den Vorteil aufweisen, Fettsäuren einer definierten Kettenlänge einzusetzen. Demgegenüber bestehen natürliche Fette aus einer erheblich voneinander abweichenden Verteilung unterschiedlich langer Fettsäuren in Triglyceriden (Souci *et al.*, 1986). Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, daß die Wahl der Substrate zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen führen kann, weil lipolytische Enzyme, Fettsäuren verschiedener Länge in unterschiedlichen Geschwindigkeiten aus Esterbindungen zu spalten vermögen. Aus diesem Grund hat es sich bei der Durchführung mikrobiologischer Tests, aber auch bei der Bestimmung von Enzymaktivitäten, als sinnvoll erwiesen, Substrate mit definierten Fettsäure-Kettenlängen einzusetzen. Allerdings erschweren in dem Tween-Nachweisverfahren die Ausfällungen der Ca-Fettsäure-Salze, die eine positive Reaktion hervorrufen, aufgrund ihrer diffusen Ausbreitung unter der Kolonie und an deren Rand eine quantitative Aussage über die Expression lipolytischer Enzyme treffen zu können (Abb. 17, 18, 20 und 23).

Das Grundgerüst von Triglyceriden, den natürlichen Substraten von Lipasen und Esterasen, setzt sich aus Glycerin, einer Kette von drei Kohlenstoffatomen, einem dreiwertigen Alkohol, zusammen. Demgegenüber handelt es sich bei der Hydrolyse der Tween-Verbindung um eine Spaltung eines Esters zwischen einer Alkoholverbindung, die ein Grundgerüst aus sechs

Kohlenstoffatomen aufweist, einem Hexit (Beyer und Walter, 1981) und einer Fettsäure. Der Reaktionsmechanismus der beteiligten Enzyme wird durch diesen stereochemischen Unterschied möglicherweise nicht unwesentlich beeinflusst sein. Allerdings ließen die vorliegenden Untersuchungen keinen Einfluß dieses Parameters erkennen. Des weiteren unterscheiden sich wasserlösliche, oberflächenaktive Tween-Verbindungen in ihrem Löslichkeitsverhalten erheblich von hydrophoben Triglyceriden natürlicher Fette. Neuere Untersuchungen an *Brevibacterium linens* konnten zeigen (Sakai *et al.*, 1999), daß eine in dem Organismus vorkommende Carboxylesterase die Fähigkeit besitzt, ein Substrat umzusetzen, dessen Grundgerüst aus einem vier Kohlenstoffatomen-langen zweiwertigen Alkohol und Acrylsäure besteht. Dies weist auf eine größere Diversität des Substratspektrums von Esterasen hin als bislang angenommen und es ist davon auszugehen, daß bei weitem längst nicht alle Verbindungsklassen bekannt sind, die von diesen Enzymen umgesetzt werden.

4.3.2 Rhodamin B-Medium

Dieses Nachweisverfahren beruht im wesentlichen darauf, daß in Gegenwart von Lipasen und Esterasen die Hydrolyse-Produkte von Fetten mit Rhodamin B einen orange-fluoreszierenden Farbstoff-Komplex bilden, der unter UV-Licht einer Wellenlänge von 350 nm zu beobachten ist (Abb. 21 und 22). Der molekulare Mechanismus dieser Reaktion wurde bislang nicht eingehender untersucht und ist somit noch weitestgehend unbekannt (Kouker und Jäger, 1986). Alle Hydrolyseprodukte von Triglyceriden können jedoch positive Reaktionen hervorrufen. Eine solche wurde sowohl in Anwesenheit von Mono- und Diglyceriden aber auch von freier Ölsäure sowie dem Natriumsalz der Ölsäure beobachtet (Kouker und Jäger, 1986). Dieser Umstand setzte ein Vorliegen von ausschließlich Triglyceriden in dem zur Herstellung von Rhodamin B-Platten verwendeten Fett voraus. Die Separation der Triglyceride von seinen Hydrolyseprodukten in Pflanzenöl und in Kokosfett wurde durch ein Säulen-chromatographisches Verfahren (Jensen, 1983) geführt und eine anschließende Auftrennung mittels Dünnschicht-Chromatographie ergab, daß die in dieser Form gereinigten Fette nur noch aus Triglyceriden bestanden (Abb. 8-16 und Tab. 3).

Rhodamin B-Platten wurden als Enzymsubstrat Pflanzenöl hinzugefügt. Diese Verbindung setzt sich hauptsächlich aus den Fettsäuren Palmitin-, Öl- und Linolsäure zusammen (Souci *et al.*, 1986). Lediglich *Staphylococcus aureus* und *Paenibacillus pabuli* M1 zeigten auf den damit

angefertigten Platten eine positive Reaktion (Tab. 4). Dabei waren jedoch erhebliche Unterschiede in der Intensität der Reaktion zu beobachten (Abb. 21 und 22). Bei *P. pabuli* M1 fiel der Nachweis schwach aus, während *S. aureus* eine sehr starke Reaktion zeigte. Solche Unterschiede lassen sich möglicherweise darauf zurückführen, daß *P. pabuli* M1 nur noch Palmitinsäure zu einem geringen Anteil aus den vorliegenden Triglyceriden spaltet, *S. aureus* aber in der Lage ist, fast alle Fettsäuren aus Esterbindungen umzusetzen. Diese Vermutung wird durch die vorliegenden Enzymkinetiken gestützt, die unter Verwendung verschieden langer Fettsäure-Verbindungen durchgeführt wurden und erkennen ließen, daß *P. pabuli* M1 kurz- und mittelkettige Fettsäuren bevorzugt aus Esterbindungen spaltet, während *S. aureus* darüber hinaus auch längere Fettsäure-Verbindungen umsetzt (Abb. 31).

4.3.3 Spirit Blue-Platten

Der Hersteller *Difco* bietet unter dem Handelsnamen *Bacto Spirit Blue-Agar* ein Verfahren zum Nachweis von Lipase-Aktivitäten auf festen Nährmedien an (2.2.11.3). Als Lipase-Reagenz wird Tributyrin eingesetzt und außerdem befindet sich der Farbstoff *Spirit Blue* in dem Nährmedium (Abb. 19). Dieser ist auch als *Anilin Blau* bekannt und besitzt die Wirkung eines pH-Indikators. Laut Marshall (1992) kann eine positive Kultur in Abhängigkeit von der Stärke der lipolytischen Aktivität entweder zu einem vollständigen klaren Ring oder zu einer mehr opaken Zone um die Kolonien führen. Darüber hinaus bewirken viele positive Kulturen eine Verfärbung in ein dunkleres Blau.

Der Nachweis einer Lipase-Reaktion ist demnach mit dem vorliegenden Verfahren nicht eindeutig zu führen (Abb. 19). Es kann eine Überlagerung zweier unterschiedlicher Effekte stattfinden. Der erste besteht darin, daß der Farbstoff vornehmlich als ein pH-Indikator wirkt. Trypton und Hefeextrakt, die in dem Medium als Bestandteile vorliegen, werden durch die untersuchten Mikroorganismen abgebaut, dadurch kann sich der pH-Wert in der Umgebung der Kolonie ändern und so zu einem Farbeffekt in Gegenwart des Indikators führen. Dieser Umstand ist darauf zurückzuführen, daß durch die Desaminierung von Peptonen der pH-Wert in der Umgebung der Kolonie sinkt, während bei der Decarboxylierung von Aminosäuren der pH-Wert ansteigt (Blazevic und Ederer, 1975). Somit kann bereits das Wachstum der untersuchten Organismen auf Trypton und Hefeextrakt zu einer Farbreaktion führen. Diese ist aber weitestgehend unabhängig davon, ob tatsächlich eine Spaltung der vorliegenden Tributyrin-

Moleküle stattfindet. Lediglich die Tatsache, daß das Tributyrin als trübe Emulsion im Medium vorliegt und die Umsetzung zu einer klaren Zone um die Kolonien herum führt, kann als eindeutiger Hinweis auf eine positive Reaktion gewertet werden. Im Detail betrachtet scheint es aus den angeführten Gründen zweifelhaft, ob das Medium in der Form, die der Hersteller angibt, seine Wirkung erfüllt oder ob nicht tatsächlich die Zugabe von *Anilin Blau* eher kosmetischer Natur ist.

4.3.4 Tributyrin Agar-Platten

Die vorliegenden Untersuchungen ließen bereits auf mikrobiologischer Ebene erkennen, daß lediglich der Tributyrin-Nachweis zu einer positiven Reaktion bei allen untersuchten Organismen geführt hatte. Nur *Escherichia coli* K12, der als negativer Kontrollorganismus mitgeführt wurde, zeigte erwartungsgemäß eine negative Reaktion (Tab. 4).

Das undefinierte Vorliegen unterschiedlich langer Fettsäureverbindungen in natürlichen Fetten führte zu einem erheblichen Defizit bezüglich der Vergleichbarkeit der angewendeten Verfahren. Tributyrin stellt neben Tween-Verbindungen das einzige Substrat auf mikrobiologische Ebene dar, in dem Fettsäuren einer definierten Kettenlänge vorliegen. Auch gewährleisteten im Vergleich zu den anderen Verfahren Tributyrin Agar-Platten einer exakten Schichtdicke durch die Ausbildung klarer Höfe um die Kolonien herum (Abb. 24), eine quantitative Aussage über die lipolytische Aktivität eines Organismus treffen zu können.

Kouker und Jäger (1986) verweisen darüber hinaus auf den Sachverhalt, daß in Gegenwart von Tributyrin nicht nur Lipasen eine positive Reaktion hervorrufen können sondern auch Esterasen. An dieser Stelle deutet sich bereits das Problem der Unterscheidung zwischen Esterase- und Lipase-Aktivität an, dem in den folgenden Abschnitten weiter nachgegangen wurde. Es läßt sich jedoch zusammenfassen, daß mittels mikrobiologischer Nachweisverfahren sehr schwer eine Grenze zwischen Lipase- und Esterase-Aktivität zu ziehen ist und unterschiedliche Verfahren zu erheblich voneinander abweichenden Ergebnissen führen können.

4.3.5 Vergleich von *Paenibacillus pabuli* M1 mit weiteren Organismen

Staphylococcus aureus DSM 20714^T wurde als positiver Kontrollorganismus mitgeführt und zeigte auf allen untersuchten Medien eine positive Lipase-Reaktion, während *Escherichia coli* K12 als negativer Kontrollorganismus eingesetzt wurde (Merck-Handbuch, 1996). Im Gegensatz

dazu steht die Beobachtung, daß auf Tween 60-Platten durchaus eine positive Reaktion auftrat (Tab. 4). Diese stimmen mit den Ergebnissen von Driessen und Stadhouders (1974) und Osamu und Shoshichi (1974) überein, die das Vorkommen einer Lipase in *E. coli* beschrieben haben. Damit konnte ein erneuter Hinweis darauf geliefert werden, daß sehr widersprüchliche Angaben über lipolytische Enzyme in der Literatur vorliegen und es sinnvoll erscheint, ein breites Spektrum von Substraten zu untersuchen, bevor eine definitive Aussage über das Vorhandensein entsprechender Enzyme gemacht wird.

Rhodamin B-Platten wurden unter Verwendung von Pflanzenöl hergestellt. Erwartungsgemäß zeigten beide Nachweisverfahren miteinander vergleichbare Ergebnisse (Rhodamin B- und Pflanzenöl-Platten, Tab. 4). Allerdings läßt sich anhand dieser Untersuchungen ebenfalls feststellen, daß der Rhodamin B-Test deutlich sensitiver funktioniert. Die Beobachtung eines fluoreszierenden Farbstoff-Komplexes unter UV-Licht benötigt möglicherweise eine deutlich geringere Ausprägung lipolytischen Aktivität zum Nachweis einer positiven Reaktion als die Entstehung von klaren Höfen um die Kolonien herum. Dabei spielen vermutlich Ladungs- sowie Diffusionseigenschaften der Enzyme im Medium, sowie deren Konzentration und Molekulargewichte eine nicht unerhebliche Rolle. Die Entstehung von klaren Höfen um die Kolonien herum setzt voraus, daß die lipolytisch-aktiven Enzyme in der gesamten Schichtdicke der Platten wirken.

4.4 Medienoptimierung

Bloquel und Veillet-Ponchet (1984) weisen daraufhin, daß eine große Anzahl von Faktoren, im wesentlichen die Zusammensetzung des Mediums, sowie weitere Parameter die Expression lipolytischer Enzyme beeinflussen; diese aber in Anwesenheit von Peptonen am stärksten ausgeprägt ist. Dahingegen zeigte *Paenibacillus pabuli* M1 sowohl auf Mineralsalzbasis-Medium mit Tween 40 als einziger Kohlenstoffquelle als auch auf 2PHP₄₀-Medium, einem peptonhaltigen, komplexen Medium, eine ausgeprägte lipolytische Reaktion. Die Zugabe von Glucose übte jedoch keinen Einfluß auf die Ausprägung dieses Merkmal aus und es ist möglicherweise davon auszugehen, daß die verantwortlichen Enzyme konstitutiv gebildet werden (Tab. 5). Bei einer Vielzahl von Autoren finden sich Hinweise, daß die Bildung extrazellulärer Enzyme durch eine große Anzahl unterschiedlichster Parameter bestimmt wird und diese für jeden Organismus empirisch zu ermitteln sind.

Untersuchungen an *Pseudomonas fluorescens* (Sugiura *et al.*, 1977) konnten eine optimale Lipase-Bildung in Gegenwart von Fleischextrakt, Polypepton, Glucose, Harnstoff und Mineralsalz-Komponenten nachweisen. Im besonderen ist der Umfang der Lipase-Produktion von der Zusammensetzung der Stickstoff- und der Kohlenstoffquelle, anorganischen Salzen, Temperatur und dem Vorliegen einer Sauerstoffatmosphäre abhängig (Brune und Götz, 1992). Sie wird für jeden Bakterienstamm von unterschiedlichen Parametern bestimmt und eine Verallgemeinerung dieser Bedingungen läßt sich nicht treffen. Die vorliegenden Untersuchungen an *Ps. fluorescens* DSM 50090^T zeigten auf Mineralsalzbasis-Medium mit Tween 40 und Glucose keine Lipase-Bildung, hingegen in Abwesenheit von Glucose eine geringe Reaktion. Dieser Umstand deutet daraufhin, daß der Organismus zur Ausprägung einer lipolytischen Aktivität ein komplexes Nährmedium benötigt und ein Vorliegen von Glucose im Medium zu einer Hemmung der lipolytischen Aktivität als dazu führt, diese zu verstärken. Damit konnten die von Sugiura *et al.* (1977) gemachten Beobachtungen an *Ps. fluorescens* nicht bestätigt werden. Es kann daher angenommen werden, daß sich bereits Angehörige verschiedener Bakterienstämme in ihrem Verhalten gegenüber bestimmten Kultivierungsbedingungen unterscheiden und die widersprüchlichen Angaben des weiteren auf die bereits diskutierten Schwierigkeiten bezüglich der Anwendung und Vergleichbarkeit unterschiedlicher Nachweisverfahren zurückzuführen sind.

S. aureus benötigte zum Wachstum ein komplexes Medium und zeigte auf 2PHP₄₀-Medium sowohl mit als auch ohne Glucose eine positive Tween-Reaktion. Diese fiel in Gegenwart von Glucose erheblich stärker aus und es ist davon auszugehen, daß die Enzymbildung nicht durch Glucose gehemmt wird.

Zielsetzung dieser Versuchsreihe war es zu ermitteln, unter welchen Bedingungen *P. pabuli* M1 für die Produktion lipolytisch-aktiver Enzyme kultiviert werden mußte. Dabei zeigte der Organismus auf 2PHP₄₀-Medium im Vergleich zum Mineralsalzbasis-Medium eine deutlich stärkere Tween-Reaktion. Durch die Zugabe von Glucose ließ sich keine signifikante Steigerung der lipolytischen Aktivität im Kulturüberstand erreichen; eine Hemmung wurde jedoch auch nicht beobachtet. Dieser Umstand legte nahe, die Kultivierung von *P. pabuli* M1 zum Nachweis von extrazellulärer lipolytischer Aktivität in 2PHP₄₀-Medium ohne Glucose durchzuführen.

4.5 Entwicklung eines Enzym-Assays zur Ermittlung lipolytischer Aktivität

Zahlreiche Verfahren zur Bestimmung von Lipase-Aktivitäten wurden beschrieben (Kouker und Jäger, 1987; Lima *et al.*, 1991; Miles *et al.*, 1992; Shelley *et al.*, 1987). Wobei Vorderwülbecke *et al.* (1990) in einer Zusammenfassung ausdrücklich betonen, daß die Unterschiede in den einzelnen Verfahrensweisen auch zu erheblichen Abweichungen in den erzielten Ergebnissen führen können. Es wurde daher ein Verfahren entwickelt, das diesem Umstand Rechnung trug, indem verschiedene Enzymsubstrate zum Einsatz kamen, die systematisch das gesamte Spektrum der Fettsäuren zwischen Butter- (C4:0) bis Ölsäure (C18:1) abdeckten und welches sich durch seine einfache Ausführung auszeichnete; d.h. die Bestimmung der Enzymaktivität wurde nach dem Abtrennen der Zellen im Überstand des flüssigen Mediums durchgeführt.

Enzyme sind in der Lage, nicht nur ein einziges Substrat umzusetzen (Bascomb, 1987). Diese Tatsache macht es möglich, *synthetische Substrate* zum Nachweis und zur Bestimmung von Enzymaktivitäten zu nutzen. Man geht dabei von der Annahme aus, daß die Affinität zum synthetischen Substrat der zum natürlichen weitestgehend vergleichbar ist. Synthetische Substrate können sich aus einer metabolischen Komponente und einer chromogenen zusammensetzen. Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren benutzt unterschiedliche α -Naphtholverbindungen zum Nachweis lipolytischer Aktivität. Dabei wird das nach der hydrolytischen Spaltung freigesetzte 1-Naphthol durch die Zugabe eines Diazofarbstoffes nachgewiesen und der dadurch gebildete Farbstoffkomplex kann bei einer Wellenlänge von 580 nm im Photometer detektiert werden (Gomori, 1954).

Die Beobachtung auf mikrobiologischer Ebene, daß bereits unterschiedliche Medien erheblich voneinander abweichende Aussagen über das Vorliegen lipolytischer Enzyme ergeben, hatte bei der Entwicklung des vorliegenden Verfahrens zu der Überlegung geführt, systematisch den Einsatz unterschiedlicher Enzymsubstrate zu testen. In Voruntersuchungen wurde zudem zunächst eine Methode des Herstellers Roche geprüft, die eine 1,2-O-Dilauryl-rac-Glycero-3-Glutarsäure-Resorufinester-Verbindung als Substrat verwendet. Mit diesem Verfahren konnte jedoch bei *P. pabuli* M1 kein Umsatz nachgewiesen werden. Erst die Entwicklung des vorliegenden Verfahrens, das auf der Anwendung verschiedener Enzymsubstrate basierte, ermöglichte eine detaillierte Aussage darüber, daß die Kettenlänge der Fettsäure am Enzymsubstrat einen erheblichen Einfluß auf die gemessene Aktivität aufweist und lieferte eine Erklärung, warum trotz positiver Ergebnisse auf mikrobiologischer Ebene das

Nachweisverfahren des Herstellers Roche zu keinem positiven Ergebnis geführt hatte.

4.5.1 Überprüfung von unterschiedlichen Emulgationsmethoden

Bascomb (1987) verweist bei der Bestimmung von Lipase-Aktivitäten auf die Notwendigkeit der Emulgation der Enzymsubstrate, weil diese in der Regel nicht wasserlöslich sind. Dieser Umstand stellt eine wesentliche Schwierigkeit dar, denn durch die Wasserunlöslichkeit der Substrate erfolgt die Ermittlung der Enzymaktivitäten in einem zweiphasigen System. Auch bei Kroll (1994) finden sich Hinweise darauf, daß bei der Ermittlung von Lipase-Aktivitäten das Vorliegen eines bestimmten Emulgationsgrades des Enzymsubstrates eine wesentliche Rolle spielt und aus diesem Grund Angaben über Lipase-Aktivitäten relativ unsicher sind.

In der Literatur werden unterschiedliche Methoden zur Emulgation von Enzymsubstraten beschrieben. Haslbeck (1985) empfiehlt die Verwendung von Glycerin und Lecithin. Allerdings war bei Anwendung dieser Emulgationsmethode eine Reproduktion der Ergebnisse zu keinem Zeitpunkt zu erzielen. Lecithin (Phosphatidylcholin) gehört zu den Glycerinphosphatiden und kann als strukturanaloge Substanz um das aktive Zentrum am Enzym konkurrieren (Karlson, 1984). Als Fettsäuren enthalten die Glycerinphosphatide die in den natürlichen Fetten vorliegenden Säuren. Es gilt fast allgemein, daß die am C-1-Atom des Glycerinmoleküls gebundene Fettsäure gesättigt ist (vorwiegend Palmitinsäure), während in C-2-Stellung meist eine ungesättigte Säure (Ölsäure, Linolsäure oder höhere Homologie) vorliegt. Durch diese strukturelle Ähnlichkeit mit dem Substrat kann es zu einer kompetitiven Hemmung bei der Bindung am aktiven Zentrum des Enzyms kommen und es ist davon auszugehen, daß dadurch das Nachweisverfahren signifikant beeinflußt wird. Dieser Sachverhalt legte nahe, in allen weiteren Arbeiten ein Verfahren zu verwenden, das Gum arabicum und Deoxycholsäure zur Emulgation der Enzymsubstrate benutzt (Winkler und Stuckmann, 1979) und sich durch seine deutlich bessere Reproduzierbarkeit ausgezeichnet hat.

Aus der Notwendigkeit der Emulgation der wasserunlöslichen Enzymsubstrate und den daraus entstehenden möglichen Streuungen bei der Messung dieser Enzymaktivitäten war die Überlegung entstanden, zunächst Kinetiken anzufertigen, um dadurch eine weitere Kontrolle des entwickelten Enzym-Assays zu erhalten. *P. pabuli* M1 wurde hinsichtlich seiner zellulären bzw. extrazellulären Aktivität mit weiteren drei Organismen verglichen. Außerdem wurde eine aufgereinigt vorliegende Lipase aus *Candida rugosa* untersucht.

4.5.2 Nachweis von Exoproteasen

Ein weiterer Umstand, der den Nachweis von Enzymen im Kulturüberstand erschwert, besteht in der Tatsache, daß viele Organismen, die Exolipasen bilden, auch Proteasen in die Umgebung sezernieren. Bei den Vertretern der Gattung *Bacillus*, bzw. *Paenibacillus*, ist das Vorkommen von Exoproteasen bekannt (Keay, 1972). Weder in den Arbeiten von Haslbeck (1985), noch in denen von McKellar (1986) wird diesem Umstand Rechnung getragen. Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Organismen wiesen eine deutliche extrazelluläre proteolytische Aktivität auf (Tab. 6). Lediglich bei *Pseudomonas fluorescens* konnte eine solche Aktivität mit der in dieser Untersuchung benutzten Methode nicht nachgewiesen werden. Auch Stead (1986) beschreibt die relativ schnelle Inaktivierung von Lipasen durch bakterielle Proteasen. Ebenso finden sich bei Anderson (1980) Hinweise darauf, daß bakterielle Lipasen durch die gleichzeitige Sekretion von Proteasen inaktiviert werden können. Dieser Effekt tritt nach Lawrence (1967) noch stärker in solchen Kulturen auf, die in einem mesophilen Temperaturbereich zwischen 30-40°C inkubiert werden. Dieser Umstand führte zu der Entscheidung, das Verfahren um die Zugabe eines Protease Inhibitor-Cocktails zu erweitern (2.1.2.1).

4.5.3 Ermittlung einer Nachweisgrenze

Es liegen zahlreiche Hinweise vor (Godfredsen, 1989), daß die Kultivierung von lipolytisch-aktiven Organismen in der Regel keinen wesentlichen Schwierigkeiten unterliegt. Allerdings erreichen die Erträge an Lipasen dabei lediglich wenige Milligramm pro Liter Medium. Diese relativ geringfügigen Ausbeuten führten zu der Überlegung, die Nachweisgrenze des erarbeiteten Verfahrens zu prüfen. Dabei konnte durch den Einsatz einer Lipase aus *Candida cylindracea* der Aktivitäts-Nachweis bis zu einer Konzentration von 0.01 mg Enzym in einem Liter Medium geführt werden.

Wird der Maßstab der Lipase-Erträge im Medium von Godfredsen (1989) zu Grunde gelegt, kann davon ausgegangen werden, daß das vorliegende Verfahren sensitiv genug wirkt. Dieser Sachverhalt wurde als ein erster Hinweis darauf gewertet, den Nachweis ohne eine Konzentration der Enzyme im Kulturüberstand durchzuführen. Darüber hinaus sollte in einer zusätzlichen Versuchsreihe die Effektivität der Ammoniumsulfat-Fällung geprüft werden.

4.5.4 Ammoniumsulfat-Fällung

Nach Cooper (1980) ist eine der am häufigsten benutzten Methoden zur Konzentration von Proteinen die Zugabe anorganischer Salze wie Ammoniumsulfat oder Kaliumphosphat. Dabei wird in Rohrpräparationen mit großem Volumen das Salz in trockener Form zugegeben. Eine schonendere Methode der Dehydration ist die tropfenweise Zugabe einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung. Dabei ist bekannt, daß erhebliche Abweichungen in den Ausbeuten bei Proteinen nach der Fällung auftreten. Bestimmte Proteine zeigen aufgrund ihrer unterschiedlichen Aminosäuresequenz ein abweichendes Löslichkeitsverhalten und reagieren auf verschiedene Reinigungs- und Konzentrationschritte mit einem daraus resultierenden sehr unterschiedlichen Verhalten (Cooper, 1980). Zucker oder Glycerin können die Fällung von Proteinen erschweren (Bertram und Gassen, 1991) weil sie die Dichte der vorliegenden Lösung, in der die Proteine gefällt werden, stark erhöhen. Ein Vorliegen solcher Verbindungen konnte im Kulturüberstand nicht ausgeschlossen werden und wurde als mögliche Erklärung für die geringen Ausbeuten nach der Ammoniumsulfat-Fällung betrachtet. Außerdem agieren Lipasen und Esterasen an wasserunlöslichen Substraten und besitzen aus diesem Grund hydrophobe Bereiche am Molekül. Als denkbare Erklärung für die relativ geringen Ausbeuten, die gemessen wurden, kann aus diesem Zusammenhang abgeleitet werden, daß die Proteine nachdem sie aus der Lösung ausgefallen waren aufgrund der genannten hydrophoben Eigenschaften nicht wieder vollständig in Lösung gebracht werden konnten und somit nicht mit dem Proteinbestimmungsverfahren erfaßt wurden. Basierend auf diesen Daten wurde in allen weiterführenden Untersuchungen darauf verzichtet, die im Kulturüberstand vorliegenden Proteine durch eine Ammoniumsulfat-Fällung zu konzentrieren und wie u.a. in der Literatur beschrieben, der Nachweis lipolytischer Aktivität direkt im Kulturüberstand geführt.

4.6 Enzym-Kinetiken

Es sind zahlreiche Methoden zum Nachweis von Lipase-Aktivitäten beschrieben worden (Kouker und Jäger, 1987; Lima *et al.*, 1991 und Miles *et al.*, 1992). Aber aufgrund sehr unterschiedlicher Durchführungen ist oftmals bereits ein Vergleich zwischen Arbeiten unterschiedlicher Labors nicht möglich (Ratledge, 1994). Ursprünglich wurden die meisten Nachweisverfahren zur Bestimmung lipolytischer Aktivitäten an Pankreas-Lipasen oder Serum Lipoprotein-Lipasen aus Säugetieren entwickelt (Stead, 1986). Diese Techniken wurden später auf Lipasen bakterieller

Herkunft übertragen.

Grundsätzlich ist die Einschränkung zu machen, daß bei allen durchgeführten Enzym-Kinetiken die in den vorliegenden Kulturüberständen vorliegenden Enzyme nicht getrennt und aufgereinigt wurden. Die Lipase aus *Candida rugosa* war das einzige untersuchte Enzym, das in gereinigter Form vorlag (Abb. A7 und A8). Deshalb ist nicht auszuschließen, daß in den zur Herstellung von Kinetiken benutzten Kulturüberständen verschiedene Enzyme gleichzeitig erfaßt wurden.

Die Anfertigung einer Genbibliothek im molekularbiologischen Teil der Arbeit hatte zu einem späteren Zeitpunkt ergeben, daß aller Wahrscheinlichkeit nach *P. pabuli* M1 nur *eine* membrangebundene *Esterase* besitzt und ansonsten über keine weiteren lipolytischen Enzyme verfügt (4.12). Die Betrachtung aller vorliegenden Ergebnisse bestätigt diese Annahme. Daraus kann weiterhin eine Korrelation zwischen den gemessenen Enzymaktivitäten und dem charakterisierten *Esterase*-Gen abgeleitet werden. Weder die Durchführung unterschiedlicher mikrobiologischer Tests, noch die biochemische Charakterisierung anhand diverser Enzymsubstrate (zellulär und extrazellulär), als auch die Anfertigung einer hinreichend großen Genbibliothek hatte zu einem Hinweis auf weitere lipolytisch-aktive Enzyme bzw. deren Gene geführt. Aus diesem Grund wurde von der begründeten Annahme ausgegangen, daß sowohl im Kulturüberstand als auch im Rohextrakt von *P. pabuli* M1 die Aktivität der vermutlich membrangebundenen *Esterase* gemessen wurde.

Bei der Betrachtung der Kettenlängenspezifitäten (Abb. 31) fällt weiterhin auf, daß *B. licheniformis* eine derart geringe Anzahl von kurzkettigen Fettsäure-Verbindungen umsetzt (C_4 - C_8), daß mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen ist, daß in diesem Kulturüberstand *eine* *Esterase* detektiert wurde. Auch bei *Pseudomonas fluorescens* konnte nur der Umsatz von Fettsäuren zwischen C_4 bis C_{12} nachgewiesen werden. Des weiteren zeigen diese Werte keine signifikanten Abweichungen und Übergänge. Ein solcher ist im Kulturüberstand von *Staphylococcus aureus* zwischen der Verwertung der Fettsäuren C_4 zu C_6 zu beobachten, so daß an dieser Stelle die Frage auftaucht, ob nicht möglicherweise zwei unterschiedliche Enzyme, eine *Esterase* und eine *Lipase*, extrazellulär vorliegen. Um diese weitergehenden Fragestellungen beantworten zu können, die jedoch nicht primär der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit entsprachen, wäre eine Aufreinigung der im Kulturüberstand vorliegenden Enzyme sinnvoll. Zunächst war aber von der Betrachtung ausgegangen worden, die im Kulturüberstand vorliegende lipolytische Aktivität bei *P. pabuli* M1 darzustellen, um später nach erfolgter Mutagenisierung eine Veränderung detektieren zu können. Die Anfertigung von Kinetiken diene

dabei zunächst, wie bereits erwähnt, der Kontrolle des entwickelten Enzym-Assays. Dabei war sowohl auf mikrobiologischer Ebene wie auch später bei der Durchführung von Kinetiken festgestellt worden, daß die Kettenlänge der verwendeten Fettsäuren am Enzymsubstrat einen erheblichen Einfluß auf die gemessene Aktivität ausübten. Um eine exaktere Aussage über diese Umstand anstellen zu können, wurden die Kulturüberstände unterschiedlicher Organismen in Hinblick auf dieses Phänomen untersucht und miteinander verglichen. Dabei entstand u.a. auch die an späterer Stelle diskutierte Fragestellung, ob es sich bei dem vorliegenden *lipolytischen Enzym* um eine Lipase oder eine Esterase handelt (4.7).

4.6.1 Kettenlängenspezifität

Kroll (1994) erklärt die mangelnde Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit einer Spezifität mikrobieller Lipasen für bestimmte Fettsäuren. So wirken Lipasen aus *Penicillium roqueforti* spezifisch auf kurzkettige und die Lipasen aus *Achromatobacter lipolyticum* und *Geotrichum candidum* setzen bevorzugt ungesättigte Fettsäuren um. Auch bei Sugihara (1988) finden sich Hinweise, daß eine Lipase aus *Aspergillus niger* vornehmlich die Fettsäuren Capryl-, Decan- und Ölsäure spaltet. Die vorliegenden Untersuchungen konnten diese beschriebenen Schwierigkeiten bezüglich der Vergleichbarkeit der Ergebnisse bestätigen und ebenfalls auf das Verhalten von Lipasen und Esterasen in Gegenwart unterschiedlicher Enzymsubstrate deutlich voneinander abweichende Aktivitäten zu zeigen, zurückführen. Es wurde nachgewiesen, daß *P. pabuli* M1 extrazellulär vornehmlich C₄- bis C₁₂-Fettsäuren hydrolytisch spaltet (Abb. 30). Außerdem lassen die vorliegenden Ergebnisse erkennen, daß Laurylsäure (C₁₂:0) im Verhältnis zu Buttersäure (C₄:0) nur noch zu einem Fünftel umgesetzt wird und damit konnte letztendlich auch eine Erklärung dafür geliefert werden, warum die Verwendung von 1,2-O-Dilauryl-rac-Glycero-3-Glutarsäure-Resorufinester-Verbindungen in Voruntersuchungen keinen positiven Nachweis erbracht hatte.

Ein Vergleich von extrazellulärer mit zellulärer Fettsäurespezifität zeigt in beiden Ansätzen tendenziell die Spezialisierung des untersuchten Organismus für Fettsäuren einer Kettenlänge bis zu zehn bzw. zwölf Kohlenstoffatomen (Abb 30). Eine solche Spezialisierung hatte sich bereits auf der Ebene der aeroben Aufnahme und Verwertung von Fettsäuren angedeutet. Beim Einsatz langkettiger Fettsäure-Verbindungen wurden demgegenüber keine Aktivitäten im Überstand und im Rohextrat gemessen (C >12). Wesentlich in diesem Zusammenhang erscheint auch noch die

Tatsache, daß die extrazelluläre mit der zellulären Enzymaktivität bezüglich der Fettsäurespezifität korreliert, dabei aber deutlich unter den dort gemessenen Werten bleibt. Im Zusammenhang mit der Lokalisation des Esterase-Gens wird auf diesen Zusammenhang noch einmal hingewiesen werden.

Arbeiten von McKellar (1986) an *Pseudomonas fluorescens* hatten gezeigt, daß die untersuchte Lipase in Gegenwart von β -Naphthyl-Caprylat (C8:0) die größte Aktivität aufwies. Mittels β -Naphthyl-Butyrat (C4:0) und β -Naphthyl-Myristat (14:0) wurden deutlich geringere Aktivitäten ermittelt. Die vorliegenden Untersuchungen stützen diese Beobachtungen (Abb. 31 und A5, A6). Das Spektrum der eingesetzten Verbindungen war aber erheblich breiter angelegt. Anhand der ermittelten Daten läßt sich der Trend ableiten, daß *Ps. fluorescens* in Verbindung mit α -Naphthyl-Caprinsäure (C6:0) die höchste Aktivität aufweist. Für α -Naphthyl-Buttersäure und α -N-Caprylsäure und α -N-Decansäure waren geringere, aber vergleichbare Aktivitäten ermittelt worden. Längerkettige Verbindungen wurden nur noch in einem sehr geringen Umfang umgesetzt (Abb. 31).

Bemerkenswert ist darüber hinaus die Tatsache, daß die aufgereinigt vorliegende Lipase aus *Candida rugosa* das einzige untersuchte Enzym gewesen ist, das in der Lage war, Ölsäure aus Esterbindungen zu spalten.

4.7 Biochemische Unterscheidung zwischen Esterasen und Lipasen

Jaeger *et al.* (1999) diskutieren eine an vielen Stellen in der Literatur zu findende Definition zur Unterscheidung von Lipasen und Esterasen. Danach setzen Lipasen bevorzugt langkettige Fettsäuren aus Estern frei ($C > 10$ Kohlenstoffatome), während Esterasen auf kurzkettige Verbindungen spezialisiert sind ($C < 10$ Kohlenstoffatome).

Lediglich die Lipase aus *Candida rugosa* war in der Lage, alle Fettsäureverbindungen zwischen C4:0 bis C18:1 zu spalten (Abb. 31). Wird die oben genannte Definition vorausgesetzt, zeigt das Aktivitätsprofil aus dem Kulturüberstand von *Bacillus licheniformis* zweifelsfrei den Charakter einer *echten* Esterase. Es wurden Aktivitäten lediglich mit Fettsäureverbindungen einer Kohlenstoffkettenlänge bis zu C8:0 nachgewiesen. Die lipolytischen Enzyme im Kulturüberstand von *Paenibacillus pabuli* M1 entziehen sich einer derart eindeutigen Zuordnung zu einer *echten* Lipase- oder Esterase-Aktivität. Bereits Jaeger *et al.* (1999) schränken ein, daß eine genaue

Definition von Lipasen und Esterasen bezüglich der Umsetzung *exakt* festgelegter Fettsäure-Kettenlängen niemals vorgenommen wurde. Aus diesem Grund ist bei Aktivitätsprofilen von Enzymen, die ein breites Fettsäurespektrum im kurz- und mittelkettigen Bereich abdecken, eine Zuordnung sowohl in die eine als auch die andere Kategorie schwierig. Dennoch wurde an dieser Stelle entschieden, das vorliegende Enzym aus *P. pabuli* M1 aufgrund seiner Umsetzung von kurz- und mittelkettigen Fettsäuren, als Esterase zu charakterisieren. Als wesentlich in diesem Zusammenhang wurde der Umstand bewertet, daß das lipolytisch-aktive Enzym aus *P. pabuli* M1 *keine* langkettigen Fettsäure-Verbindungen ($C > 14$ Kohlenstoffatome) umsetzt.

Bei Lipasen sind neben den dargestellten Präferenzen für bestimmte Fettsäuren auch die Bevorzugung bestimmter regiospezifischer Positionen im Triglycerid-Molekül beschrieben worden. Godfredsen (1989) beschreibt des weiteren den Einfluß von Doppelbindungen in Fettsäuren auf die vorhandene Aktivität der Enzyme. Es wurde außerdem beobachtet, daß eine Lipase aus *Geotrichum candidum* bevorzugt ungesättigte Fettsäuren aus Triglycerid-Molekülen spaltet, während entsprechende Enzyme aus *Fusarium oxysporum* vorrangig die hydrolytische Freisetzung von gesättigten Fettsäuren katalysieren. In den vorliegenden Untersuchungen war ausschließlich die Lipase aus *Candida rugosa* in der Lage, Ölsäure als einfach ungesättigte Verbindung hydrolytisch zu spalten. Bezeichnenderweise ist diese Lipase das einzige untersuchte Enzym, das aus einem eukaryontischen Organismus stammt; alle weiteren Enzyme waren ansonsten bakteriellen Ursprungs.

Die dargestellten Untersuchungen lieferten weitere Belege dafür, daß lipolytisch-aktive Enzyme eine Präferenz für bestimmte Fettsäuren (Kroll, 1994) aufweisen. Dabei spielt nicht nur das Vorliegen von Doppelbindungen sondern auch die Kettenlänge der untersuchten Fettsäuren eine entscheidende Rolle (Godfredsen, 1989). Die verschieden langen Fettsäuren wurden in deutlich abweichenden Geschwindigkeiten hydrolytisch gespalten. Dieser Umstand machte es möglich, für lipolytische Enzyme aus verschiedenen Organismen ein Aktivitätsprofil (Abb. 30 und 31) zu erstellen. Außerdem erklären diese Zusammenhänge, warum es bei der Durchführung von unterschiedlichen Methoden zu erheblichen Abweichungen in den Ergebnissen (Ratledge, 1994) kommen kann.

Es liegen derzeit weder präzise Definitionen vor, wodurch sich eine Lipase- von einer Esterase-Reaktion unterscheidet, noch existieren eindeutige Angaben darüber, mittels welcher Substrate die Aktivitäten bestimmt werden sollten. Beide Festlegungen scheinen aber durchaus notwendig zu sein, um zu exakten, vergleichbaren und reproduzierbaren Aussagen kommen zu können.

Kroll (1994) führt die Schwierigkeiten u.a. beim Vergleich lipolytischer Aktivitäten auf den unterschiedlichen Emulgationsgrad, in der die hydrophoben Enzymsubstrate vorliegen, zurück. Aus diesem Grund wäre es weiterhin sinnvoll zu fordern, die eingesetzten Emulgationsmethoden für die Enzymsubstrate ebenfalls einer Standardisierung zu unterziehen.

4.8 UV- und NTG-Mutagenisierungen an *Paenibacillus pabuli* M1

Üblicherweise werden Mutagenisierungen durchgeführt, um Mangelmutanten zu erzeugen, die sich aufgrund ihres Defektes als Untersuchungsobjekte für physiologische und genetische Fragestellungen eignen (Drake, 1989). In dieser Arbeit wurde dagegen versucht, durch Mutationsereignisse positive Effekte zu erzielen (3.7).

Entsprechende Verfahren werden vor allem in der industriellen Mikrobiologie im Bereich der Stammentwicklung durchgeführt. Bereits Godfredsen (1989) weist daraufhin, daß es gebräuchlich ist, solche Screening-Systeme in einem semi-quantitativen Verfahren einzusetzen. Diese werden innerhalb von Mutationsprogrammen erarbeitet, die zum Ziel haben, die enzymatische Aktivität der Organismen zu steigern. Informationen über solche Arbeiten stehen allerdings nur in geringem Umfang in der Literatur zur Verfügung.

Die Evolution der Organismen nutzt die Variabilität der Genome z.B. durch Spontanmutations-Ereignisse für die Optimierung biologischer Systeme. Daraus kann man ableiten, daß auch der derzeitige Zustand eines Organismus durch Mutationsereignisse verbesserbar sein kann. Notwendigerweise sollten dabei große Populationen und ein geeignetes Screening-System zur Verfügung stehen.

Da die untersuchte Esterase aus *P. pabuli* M1 vorwiegend hohe Umsätze im Bereich der kurz- und mittelkettigen Fettsäuren erzielte (Abb. 30), wurde der Wildtyp zunächst in Gegenwart von α -Naphthyl-Caprylat ausführlich charakterisiert (Tab. 7). Ein Vergleich mit den mutagenisierten Stämmen ließ eine signifikante Steigerung dieser Aktivität um einen Faktor von 3 bis 4 erkennen (Tab. 8). Die für den Wildtyp erhobenen Daten, die in 20 voneinander unabhängig durchgeführten Messungen ermittelt wurden, unterlagen einer geringfügigen Streuung (Abb. 32). Diese ergibt sich in erster Linie aus der Notwendigkeit, das verwendete Enzymsubstrat zu emulgieren. Betrachtet man im Vergleich dazu den Auftrag der errechneten Mittelwerte der mutagenisierten Stämme, läßt sich ein eindeutiger Trend ableiten (Tab. 8), daß jene Stämme, die zuvor einer Mutagenisierungsprozedur unterzogen worden sind, deutlich stärker streuten (Abb.

32). Die Signifikanz in der Ausprägung dieses Unterschiedes kann nicht nur auf die Emulgation des Enzymsubstrates zurückgeführt werden, weil ansonsten die Streuung in beiden Ansätzen vergleichbar gewesen wäre. Diese Abweichungen können als ein weiterer Hinweis auf mögliche Mutationsereignisse gewertet werden.

Auffällig erscheint des weiteren die Häufigkeit, in welcher Mutanten mit einer gesteigerten lipolytischen Aktivität auftraten (Tab. 7 und 8). Als Erklärung für dieses Phänomen kann betrachtet werden, daß trotz Einhaltung der in der Literatur beschriebenen Keimzahlen und Inkubationszeiten (Carlton und Brown, 1981), bereits in der Outgrowth-Phase, die im Anschluß an die Mutagenisierungsarbeiten durchgeführt wurde, eine Anreicherung und Vermehrung stattgefunden hatte. Es ist also möglicherweise nicht von zahlreichen, unabhängig voneinander entstandenen positiven Mutationen auszugehen, sondern davon, daß im Ursprung nur ein solches günstiges Mutationsereignis gestanden hat.

Prokaryontische Strukturgene (Glick und Pasternak, 1995) werden entweder kontinuierlich transkribiert (konstitutive Expression) oder reguliert (regulierte Expression). Die vorliegenden Untersuchungen an *Paenibacillus pabuli* M1 hatten ergeben, daß die gebildete Esterase aller Voraussicht nach konstitutiv exprimiert wird und keiner Hemmung durch Glucose unterliegt (3.4). Die Ausschaltung einer solchen Repression kann als ein mögliches Angriffsziel für die Steigerung einer bestimmten Enzymaktivität durch Mutagenese betrachtet werden, trifft aber aus den genannten Gründen nicht auf den vorliegenden Organismus zu. Ein weiterer Mechanismus, der zur Steigerung extrazellulärer Enzymaktivität führen kann, besteht in der Erhöhung der Stabilität des betreffenden Proteins gegenüber Proteasen oder in deren Inaktivierung. *P. pabuli* M1 exprimiert proteolytische Aktivität (Tab. 6). Diesem Angriffspunkt einer positiven Mutation wurde jedoch nicht weiter nachgegangen.

Weiterhin sei in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, daß die vorliegenden Untersuchungen im Rahmen der Markteinführung und Weiterentwicklung eines umweltschonenden Verfahrens zur Behandlung von Abwassersystemen mit der Henkel KGaA durchgeführt wurden. Im Vorfeld dazu wurden Untersuchungen an den mutagenisierten Stämmen 34.7, 34.8, 34.16, 35.3 und 35.7 durchgeführt (Tab. 8). Diese fanden unter standardisierten Bedingungen in entsprechenden Abwassersystemen statt. Auch durch diese Probeanwendungen konnte gezeigt werden, daß die getesteten Stämme sich gegenüber dem Wildtyp von *Paenibacillus pabuli* M1 durch eine deutliche Steigerung ihrer Enzymaktivität auszeichneten (Sczesny, mündliche Mitteilung). Diese Organismen werden in der Zwischenzeit durch die

Henkel KGaA u.a. in den Produkten Ecozyme Max Power, Ecozyme Drainfresh oder Ecozyme Plus+ im Einzelhandel und im Internet angeboten.

Seit langer Zeit ist der Umstand bekannt, daß die Steigerung einer Enzymaktivität auch auf das Vorhandensein von Tandem-Duplikationen zurückzuführen ist. Untersuchungen des *lac*-Operons an *E. coli* hatten gezeigt (Horiuchi, 1963), daß das Vorhandensein von Tandem-Duplikationen in diesem Genbereich für eine Zunahme des Wachstums auf Lactose verantwortlich war.

Weiterführende Untersuchungen mittels Makrorestriktionsanalyse sollten deshalb zeigen, ob die genannten Tandem-Duplikationen für eine Steigerung der lipolytischen Aktivität im Kulturüberstand von *P. pabuli* M1 verantwortlich waren.

4.9 Tandem-Duplikationen

Es ist bekannt und kann als eine mögliche Erklärung für die Effektivität von insbesondere UV- und NTG-Mutagenisierungen gelten, daß diese Agenzien Duplikationen in bakteriellen Genomen hervorrufen. DNA-zerstörende Prozesse können die Bildung von Duplikationen verstärken.

Dieses Phänomen wird auf den Zusammenhang zwischen Stimulierung homologer Rekombination und DNA-zerstörender Prozesse zurückgeführt (Hill und Cambriato, 1973; Hill *et al.*, 1977; Hoffmann *et al.*, 1978; Heath und Weinstock, 1991; Heath, 1992).

Unabhängig von der Gegenwart der genannten mutagenen Agenzien treten Duplikationen relativ häufig in bakteriellen Chromosomen auf (Riley und Aniolis, 1978). Sie scheinen eine nicht unbedeutende Rolle in evolutionären Prozessen zu spielen und können eine Größe von 320 kb erreichen (7% des *Escherichia coli* Chromosoms). Genetische Studien an dem Gram-negativen Organismus *Salmonella typhimurium* konnten unter nicht-selektiven Kulturbedingungen spontane Duplikationen an bestimmten Punkten der untersuchten DNA mit einer Häufigkeit von 10^{-5} bis 3% nachweisen. Ein bestimmter Gen-Locus liegt in jeder 1000. Zelle in duplizierter Form. Auch chromosomale Analysen von Duplikationen in der *lac*-Region bei *Escherichia coli* führten zu der Feststellung, daß dieser DNA-Abschnitt in der Regel zu 0.7% in duplizierter Form auftritt. Bakterielle Populationen weisen somit eine relativ hohe Rate an Duplikationen auf (Heath und Weinstock, 1991). Durch diese Beobachtungen wird die Hypothese gestützt, daß sich das bakterielle Chromosom in einem steten Veränderungsprozeß befindet, währenddessen Duplikationen erworben werden und ebenso wieder abhanden kommen (Anderson und Roth, 1977, 1978).

Das Vorliegen eines bestimmten chromosomalen Abschnitts in duplizierter Form läßt darauf schließen, daß entsprechende Genprodukte in erhöhtem Maße gebildet werden. Der Erwerb von Tandem-Duplikationen ist als Möglichkeit einer bakteriellen Population zu betrachten, auf ökologische Veränderungen zu reagieren und für eine gewisse Zeit mit einer erhöhten z.B. enzymatischen Expression zu antworten.

4.10 Makrorestriktionsanalyse

Die in dieser Arbeit mutagenisierten Stämme hatten eine signifikant gesteigerte lipolytische Aktivität gezeigt. Aus diesem Grund lag die Annahme nahe, den Zuwachs an Enzymaktivität auf das Auftreten von Tandem-Duplikationen in den Genomen der Organismen zurückzuführen (3.8). Nach Weinstock (1994) ist die Makrorestriktions-Analyse eine geeignete Methode zum Nachweis von Tandem-Duplikationen. Deshalb wurden zunächst unterschiedliche Restriktions-Endonukleasen (RE) auf ihre Eignung als selten-schneidende Enzyme getestet. Die Häufigkeit für das Auftreten einer Erkennungssequenz in einem Genom hängt von der Länge der Zielsequenz der RE, vom GC-Gehalt der bakteriellen DNA und vom Codongebrauch des zu analysierenden Mikroorganismus ab. Bei der Auswahl einer geeigneten, selten-schneidenden Restriktions-Endonuklease gilt die Erkennungssequenz als eines ihrer hauptsächlichsten Merkmale. Dabei ist von Bedeutung, daß eine Restriktions-Endonuklease um so seltener schneiden wird, je länger die Erkennungssequenz ist. Für die Makrorestriktionsanalyse sind folglich nur Enzyme geeignet, die eine Sequenz aus mindestens sechs Nukleotiden aufweisen (Grothues *et al.*, 1991). Restriktions-Endonukleasen mit einer Erkennungsregion, die aus acht Nukleotiden bestehen, sind die in diesen Untersuchungen eingesetzten Enzyme *AscI* (GG/CGCGCC), *PacI* (TTAAT/TAA), *PmeI* (GTTT/AAAC), *SfiI* (GGCCNNNN/NGGCC) und *SwaI* (ATTT/AAAT). Auch *SpeI* (A/CTAGT) sollte die meisten prokaryontischen Genome selten schneiden, weil es das Tetranukleotid $5'$ -CTAG- $3'$ in seiner Erkennungssequenz aufweist. McClelland *et al.* (1987) konnten zeigen, daß $5'$ -CTAG- $3'$ in bakteriellen Chromosomen ungefähr 12.5fach seltener vorkommt als die Berechnungen der Oligonukleotid-Wahrscheinlichkeiten erwarten lassen. Diese Tatsache läßt sich zum Teil dadurch begründen, daß $5'$ -CTAG- $3'$ sowohl die Basensequenz des am seltensten vorkommenden Stopcodons TAG als auch die des äußerst seltenen Leucin-Codons CTA aufweist. Die vorliegenden Untersuchungen hatten ergeben, daß ein Verdau durch *SwaI* zunächst die besten Ergebnisse bei der Fragmentierung des Genoms von *Paenibacillus pabuli* M1 lieferte. Das

gesamte Genom der untersuchten Organismen ließ sich damit in ca. 24 Fragmente (Abb. 33) schneiden und mittels *Rampings* unter Einhaltung zweier linearer Rampen von 1-25 Sekunden für 15 Stunden und 0.5-10 Sekunden für 12 Stunden in der Elektrophorese-Kammer separieren. Die erzielten DNA-Fragmente erreichten dabei Größenordnungen zwischen 15 bis 400 kb.

Eine Erklärung für eine nicht exakte Reproduktion von Bandenmustern kann in geringfügig voneinander abweichenden Elektrophorese-Bedingungen gesehen werden, die in verschiedenen Läufen auftreten können und dazu führen, daß Doppelbanden sich auftrennen und als zwei unterschiedliche DNA-Fragmente zu erkennen sind. Die Auftrennung von DNA-Molekülen durch andere Gelelektrophorese-Verfahren ist gegenüber der Makrorestriktionsanalyse jedoch dadurch begrenzt, daß Moleküle, die wesentlich größer als 20 kb sind, mit gleicher Geschwindigkeit wandern und dadurch eine Kompressionsbande bilden. Diese läßt sich nicht weiter auftrennen (Cantor *et al.*, 1988). Die PFGE bietet den Vorteil, eine Überwindung dieser Auftrennungsgrenze zu ermöglichen (Schwartz und Cantor, 1984) und erreicht eine Auflösung von DNA-Molekülen bis zu einer Größe von 2 Mb.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß nach Ermittlung geeigneter Laufparameter, eine Separation der zuvor durch *SwaI*-verdauten DNA-Fragmente durchführbar war und sich anschließend das gesamte Genom des Ausgangsstammes mit 26 mutagenisierten Organismen vergleichen ließ. Auf dieser Ebene waren nur geringfügige Unterschiede zu erkennen und es kann als wahrscheinlich betrachtet werden, daß die Genome der mutagenisierten Organismen keine Tandem-Duplikationen aufwiesen, weil keine signifikanten Unterschiede in Form von z.B. neuen Fragmenten auftraten.

4.11 Anfertigung einer Genbibliothek

Die Sequenzierung des Esterase-Gens, setzte voraus, eine Genbibliothek anzufertigen und das funktionelle Gen in dem verwendeten Vektor zu exprimieren (3.9). Weil weder Aminosäure- noch Nukleinsäure-Sequenz bekannt gewesen ist wurde anschließend ein Screening der Klone auf Tributyrin Agar-Platten durchgeführt.

Dazu wurde zunächst ein Partialverdau des Genoms von *Paenibacillus pabuli* M1 unter Verwendung von *EcoRI* vorgenommen (Abb. 36). Die entstandenen Fragmente erreichten Größenordnungen von 2 bis 13 kb und lagen damit innerhalb der Ligationskapazität des

verwendeten pBluescript® II SK (+) Phagemid-Vektors. Bei Phagemiden handelt es sich um Vektoren, die sowohl Phagen- als auch Plasmid-Eigenschaften aufweisen. Außerdem besitzt pBluescript eine Polylinkerregion mit u.a. einer *EcoRI*-Schnittstelle. Diese wird flankiert durch die T7- und T3-RNA-Polymerase Promotoren. Von insgesamt ca. 10.000 hergestellten Klonen zeigten acht auf Tributyrin Agar-Platten eine Expression lipolytischer Aktivität. In diesem Zusammenhang kann festgestellt werden, daß Tributyrin als Substrat ausgewählt worden war, weil bereits die Durchführung von Kinetiken (Abb. 26 bis 29) und das daraus abgeleitete Aktivitätsprofil (Abb. 30) die lipolytischen Enzyme im Kulturüberstand von *Paenibacillus pabuli* M1 als Esterasen ausgewiesen hatten. Tributyrin, das als Triglycerid an allen drei Positionen mit Buttersäure (C4:0) verestert ist, kann in erster Linie als Esterase-Substrat betrachtet werden. Darüber hinaus wird es auch von Lipasen umgesetzt (Kouker und Jäger, 1986). Bei der Anfertigung der Genbibliothek wurden Organismen, die das unligierte Plasmid aufwiesen, aber auch solche, die nicht transformiert waren, als Kontrollen verwendet und zeigten ein negatives Verhalten auf Tributyrin-Medium. Damit war zweifelsfrei erwiesen, daß das gesuchte Gen auf dem ligierten Insert liegen mußte und exprimiert wurde. Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, das Tributyrin als Enzymsubstrat wenig spezifisch aufgrund der geringen Fettsäurekettenlänge und die Genbibliothek groß genug angelegt gewesen ist (3.9.4), um jedes Gen zu detektieren, das für Lipase- oder Esterase-Aktivität codiert und innerhalb der Größe der verwendeten Fragmente liegt. Es wurden acht positive Klone gescreent, die Esterase-Aktivität exprimierten. Die DNA dieser Klone wurde in allen acht Fällen mittels Esterase-PCR amplifiziert. Gleichzeitig konnte ausgeschlossen werden, daß weder die chromosomale DNA der ultrakompetenten *E. coli*-Zellen, noch deren Plasmid-DNA, Primer-Bindungsstellen aufwiesen. Die Amplifikate wurde anschließend mittels eines Primers über eine Länge von ca. 360 Nukleotiden sequenziert (Abb. A10). Alle untersuchten Basen erwiesen sich als identisch. Damit konnte unter den beschriebenen Bedingungen nur ein Esterase-Gen im Genom von *Paenibacillus pabuli* M1 nachgewiesen werden. Dieser Sachverhalt legt eine Beziehung zwischen der Esterase-Aktivität im Kulturüberstand und jener im Rohextrakt nahe. Für eine Korrelation zwischen extra- und intrazellulärer Enzymaktivität spricht auch der Umstand, daß beiden eine Spezifität für vergleichbare Fettsäuren nachzuweisen war.

Die zuvor durchgeführte M13-PCR mit der DNA aller acht positiv-gescreenten Klone ergab im Gegensatz zu der Esterase-PCR nur in vier Fällen ein Produkt. Möglicherweise waren die klonierten Inserts für eine Amplifikation mittels der verwendeten Taq-Polymerase zu groß oder

die PCR-Bedingungen limitierten die Amplifikation der Inserts einer bestimmten Größe (z.B. Magnesium-Konzentration, Extentionszeiten).

4.12 Lokalisation des Esterase-Gens

Mehrere Beobachtungen führen zu der Annahme, daß das Esterase-Gen aus *Paenibacillus pabuli* M1 für eine membrangebundene Esterase codiert. Zum einen wurde nach Anfertigung einer ausreichend großen Genbibliothek nur ein Esterase-Gen gefunden und zum anderen korreliert die extrazelluläre mit der intrazellulären Enzym-Aktivität bezüglich der Spezifität für bestimmte Fettsäure-Kettenlängen (3.6.1 und 3.6.2). Intrazellulär wurden deutlich geringere Werte gemessen. Diese Daten bestätigen auch die von Prim *et al.* (2000) gemachten Beobachtungen an einer membrangebundenen Esterase, wonach die dort ermittelte Aktivität geringer ist, als die im Kulturüberstand gemessene. Darüber hinaus weist auch die Abwesenheit eines Signalpeptides auf ein membrangebundenes Enzym hin (3.9.9) und als eine zusätzliche Bestätigung dieser Annahme kann das Auftreten eines Tripeptids (RGD) in der C-terminalen Region der Aminosäure-Sequenz von *Paenibacillus pabuli* M1 betrachtet werden (Abb. 39). Dieses Motiv wurde bereits bei zahlreichen membrangebundenen Enzymen nachgewiesen (Prim *et al.*, 2000).

4.13 Annotation des Esterase-Gens

Die Sequenzierung des Inserts von Klon est27 wurde sowohl in 5'-3' als auch auf dem komplementären Strang in umgekehrter Richtung anhand eines sogenannten *Primer Walkings* durchgeführt und lieferte die Nukleinsäuresequenz des untersuchten Esterase-Gens. Danach wurde unter Berücksichtigung aller sechs translatierbaren Varianten ein *open reading frame* (ORF) festgelegt (Abb. 39). Das *geneMark*-Programm (2.1.4) analysiert eine Sequenz unter Anwendung eines Organismus-spezifischen *Codon-usage*. Die graphische Darstellung gibt die Kodierungs-Wahrscheinlichkeit in allen 6 Leserastern wieder. Potentielle kodierende Bereiche sind dadurch sofort erkennbar. Des weiteren liefert das Programm Informationen über mögliche Sequenzierfehler und *frame shifts* (Rauhut, 2001). Einen zusätzlichen Hinweis darauf, daß der festgelegte *open reading frame* das gesuchte Gen umfaßte, ergab der *Open Reading Frame Finder* (2.1.4). Auch dieses Internet-Programm, das eines der Web-Tools darstellt, welches vom NCBI (National Center for Biotechnology) angeboten wird, detektiert mögliche ORFs anhand der Erkennung von Start- und Stop-Codons. Anschließend erfolgte eine BLAST-Analyse; dabei

wurde die *query sequence* unter Verwendung des BLASTX2.2.3-Programmes in alle möglichen *reading frames* übersetzt und gegen Proteinsequenzen unterschiedlicher Datenbanken verglichen. Rauhut (2001) empfiehlt Homologiesuche unter Verwendung von Proteinsequenzen, weil diese in der Lage seien, entferntere Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Genen besser herauszuarbeiten. Er führt als Erklärung dafür an, daß im Gegensatz zu DNA-Sequenzen Aminosäuren chemische Eigenschaften besitzen und nicht nur den *Code* darstellen. Auch sei bei der BLAST-Analyse der benutzerdefinierte E-Wert besser als der *bit score* geeignet, die Signifikanz eines bestimmten Ergebnisses abzuschätzen. Der benutzerdefinierte E-Wert reflektiert dabei die Anzahl von Zufallstreffern in einer Datenbank bestimmter Größe. Darüber hinaus führt Rauhut (2001) aus, daß Treffer mit einem E-Wert von 10^{-2} als sehr selten und als ein eindeutiger Hinweis auf echte Homologie zu betrachten sind. Scores bis zu $1e-50$ können demnach als ein sicherer Beleg für eine evolutionäre Beziehung zwischen den Sequenzpaaren betrachtet werden.

Die Aminosäuresequenz des Esterase-Gens aus *Paenibacillus pabuli* M1 erzielte bei den ersten fünf erreichten Treffern E-Werte von $3e-45$ bis $3e-37$. Gemessen an den von Rauhut (2001) gemachten Annahmen, sprechen diese Daten für ein deutliches Verwandtschaftsverhältnis. Bedauerlicherweise waren die betroffenen Proteine nicht genauer charakterisiert. Sie lagen in der Datenbank lediglich unter der Bezeichnung *conserved hypothetical protein* vor und aus diesem Grund war eine Auswertung bezüglich der Funktion nicht möglich. In der weiteren Auflistung der Treffer fanden sich an folgenden Positionen: 7. *Mycobacterium tuberculosis*, Transesterase, ($4e-34$); 9. *Brevibacterium linens*, 1,4-Butandiol Diacrylat-Esterase ($1e-28$); 12. *Burgholderia gladioli*, Dfp-Inhibierte Esterase ($5e-24$); 15. *Aspergillus terreus*, Transesterase ($7e-17$). Gemessen an der taxonomischen Distanz dieser Organismen zu *Paenibacillus pabuli* M1 erreichen sie erstaunlich geringe E-Werte und damit kann nach der Definition von Rauhut (2001) davon ausgegangen werden, daß ein eindeutiger Hinweis auf Homologie zwischen den beschriebenen Enzymen und der Esterase aus *Paenibacillus pabuli* M1 vorliegt (Abb. 41). Als ein weiteres überzeugendes Argument für die Signifikanz des vorliegenden BLAST-Resultates kann betrachtet werden, daß die *query sequence* ausschließlich mit Aminosäure-Sequenzen verglichen wurde, die das konservierte Motiv S-X-X-T aufwiesen und hinsichtlich ihrer Funktion als Esterase charakterisiert waren. Es haben sich in den vergangenen Jahren etliche Hinweise darauf ergeben, daß einige Esterasen mit β -Lactamasen, Penicillin-bindenden Enzymen sowie mit DD-Peptidasen Ähnlichkeiten zeigen. Wagner *et al.* (1997) gruppieren die β -Lactamasen der

Klasse A in die Superfamilie der Serin β -Lactamasen, die ebenfalls eine ganze Anzahl von Penicillin-bindenden Enzymen aufweist. Die genannten Enzyme werden durch das Auftreten des konservierten Motivs gekennzeichnet (S-X-X-T), das auch bei *P. pabuli* M1 detektiert wurde. Nach Jaeger *et al.* (1999) werden drei Enzyme durch das Vorliegen dieses Motivs charakterisiert und in der Enzymfamilie VIII zusammengefaßt. Dabei handelt es sich zum einen um eine stereoselektive Esterase aus *Arthrobacter globiformis*, eine Zellwand-gebundene Esterase aus *Streptomyces chrysomallus* und eine Esterase aus *Pseudomonas fluorescens*. Darüber hinaus verweist auch er auf die Verwandtschaftsverhältnisse zu β -Lactamasen. Die drei in der Familie von Jaeger *et al.* (1999) zusammengefaßten Enzyme zeigen ein weiteres interessantes Phänomen. Die Esterasen aus *Pseudomonas fluorescens* und *Streptomyces chrysomallus* wiesen das von Lipasen und Esterasen der α/β Hydrolase-Superfamilie bekannte Motiv G-X-S-X-G im C-terminalen Bereich ihrer Aminosäuresequenz auf. Bei *Arthrobacter globiformis* konnte eine solche Sequenz nicht detektiert werden. Auch bei *Paenibacillus pabuli* M1 war diese Sequenz nicht zu finden.

Neuere Untersuchungen mittels Röntgenstrukturanalysen und site-directed Mutagenese an einer Esterase aus *Burgholderia gladioli* haben zu der Erkenntnis geführt (Wagner *et al.*, 2002), das der Serinrest innerhalb des S-X-X-K Motivs am katalytischen Mechanismus beteiligt sein muß. Das Alignment der Aminosäuresequenzen verwandter Esterasen in Abb. 41 zeigt eine exakte Übereinstimmung der Position des Serins zwischen der Esterase aus *P. pabuli* M1 und dem Enzym aus *Burgholderia gladioli*. Aus diesem Grund kann mit aller Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, daß auch bei *P. pabuli* M1 der Serinrest und damit das gesamte konservierte Motiv am katalytischen Mechanismus beteiligt ist.

Die durchgeführte BLAST-Analyse konnte ebenfalls eine Verwandtschaft zu Penicillin-bindenden Enzymen und β -Lactamasen aufzeigen. Jaeger *et al.* (1999) beschreiben die Angehörigen ihrer Enzymfamilie VIII als Esterasen, die sich aus ca. 380 Aminosäuren zusammensetzen. Die Esterase aus *P. pabuli* M1 wies eine Länge von 377 Aminosäuren auf. Beide Charakteristika, die Länge und das Vorliegen des konservierten Motivs S-X-X-T wiesen das untersuchte Enzym aus *Paenibacillus pabuli* M1 als einen eindeutigen Vertreter der Familie VIII nach Jaeger *et al.* (1999) aus, in der ausschließlich Esterasen zusammengefaßt werden. Ein Alignment ließ ebenfalls deutliche Übereinstimmungen erkennen. Es kann also zusammenfassend davon ausgegangen werden, daß die molekularbiologische Zuordnung anhand eines Datenbankabgleiches die

biochemische Charakterisierung bestätigt hat.

4.14 Nachweis von Promotorelementen, Shine-Dalgarno-Boxen und Signalpeptiden

Das verwendete PRODORIC Matrix Search Programm identifizierte zum einen die Consensus Bereiche (-33-TTGAAT)-19-(-8-TAGTAT) mit einer vergleichsweise guten Trefferquote von 86.31% an Position -33 und von 83.42% an Position -8. Zum anderen hat das Programm an Position -22 noch einen weiteren -10 Consensus Bereich (TATATT) mit einer Matrix Similarity von 93.19% finden können. Eine dazugehörige -35 Region ließ sich nicht ermitteln.

Möglicherweise handelt es sich bei diesem Signal um ein Artefakt, das keine weitere biologische Relevanz aufweist. Außerdem wurden eine beträchtliche Anzahl bakterieller Promotorsequenzen noch nicht beschrieben und werden aus diesen Gründen durch die verwendeten Programme nicht erkannt (Eskin und Pevzner, 2002).

Die Proteinsynthese ist ein Prozeß, der aus zwei Schritten besteht. Zuerst wird die DNA durch einen RNA Polymerase-Komplex in mRNA transkribiert und letztere wird anschließend von einem Ribosom in die Aminosäuresequenz translatiert. Die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA benötigt keinen Primer, ist aber auf der Vorhandensein von Promotorbereichen angewiesen. Diese setzen sich aus den Consensus Regionen -10 und -35 zusammen. Darüber hinaus liegt bei hochexprimierten Genen weiter *upstream* eine AT-reiche Sequenz, die UP-Box. Vergleiche zwischen den vorliegenden -35 und -10-Regionen aus *Paenibacillus pabuli* M1 und dem starken *recA*-Promotor aus *E. coli* lassen erkennen (Abb. 40), daß jeweils acht von insgesamt zwölf untersuchten Basen übereinstimmen und der Spacerbereich um eine Base verlängert ist. Geht man von den Beobachtungen an *E. coli* über starke und schwache Promotoren aus, kann in diesem Fall geschlußfolgert werden, daß es sich hierbei um einen vergleichsweise schwachen Promotor handelt.

Die Erkennung von Shine-Dalgarno-Boxen (SD) beruht ebenfalls im wesentlichen auf Untersuchungen, die an *E. coli* gemacht wurden. Sie stellt die Sequenz dar, die die Bindung an das Ribosom gewährleistet. Es ist bekannt, daß die SD-Sequenz komplementär zum 3'-Ende der 16S rRNA ist. Als optimale SD-Box wird die Sequenz TAAGGAG betrachtet. Sie gilt als konserviert, wobei allerdings die Nukleotide AGGA den am stärksten konservierten Bereich

darstellen.

Darüber hinaus ist bekannt, daß eine Translation auch ohne SD-Box möglich ist. Der vorliegenden Nukleinsäure-Sequenz des Esterase-Gens aus *P. pabuli* M1 ließ sich keine der genannten Sequenzabschnitte zuordnen. Arbeiten an *E. coli* hatten gezeigt, daß in einem Viertel aller untersuchten Gene keine SD-Box nachgewiesen werden konnte (Kibler und Hampson, 2001).

Signalpeptide kontrollieren den Transport von Proteinen durch die Zellwand von Organismen. Bei einer Vielzahl unterschiedlicher eukaryontischer und prokaryontischer Organismen wurden Signalpeptide nachgewiesen. Diese bestehen aus einer bestimmten Aminosäuresequenz am N-terminalen Ende des eigentlichen Proteins. Es wurden sowohl bei Gram-positiven als auch bei Gram-negativen Bakterien Signalpeptide nachgewiesen und aus diesem Grund ist davon auszugehen, daß der Zellwandaufbau eines bestimmten Organismus anscheinend eine weniger bedeutende Rolle in diesem Zusammenhang spielt. Das Signalpeptid wird nach der Translokation durch die Zellwand vom eigentlichen reifen Protein getrennt. Die gemeinsame Struktur von Signalpeptiden wird derzeit durch eine positiv geladene N-region, eine hydrophobe H-Region und eine neutrale, aber polare C-Region, beschrieben (Nielsen *et al.*, 1997). Untersuchungen der Aminosäuresequenz der Esterase aus *P. pabuli* M1 hatte keinen Nachweis eines Signalpeptides ergeben. Das Auftreten eines bestimmten Tripeptides in der Aminosäuresequenz hatte zu dem Hinweis geführt, das es sich um eine membrangebundene Esterase handelt (Abb. 39). Diese Annahme wurde durch weitere Daten bestätigt. Dazu gehört in diesem Zusammenhang auch, daß bei membrangebundenen Enzymen keine Signalpeptide nachgewiesen wurden.

4.15 Mutationen

Die Mutagenisierungsarbeiten hatten einen signifikanten Anstieg der lipolytischen Aktivität im Kulturüberstand von *Paenibacillus pabuli* M1 zur Folge gehabt (4.8). Diese Ergebnisse wurden sowohl auf den zum Screening benutzten Tributyrin Agar-Platten als auch auf biochemischer Ebene durch Verwendung von α -Naphthyl-Caprylat als Enzymsubstrat nachgewiesen (Tab. 8). Ebenso hatten Untersuchungen der Henkel KGaA in einem standardisierten Abwassersystem ergeben, daß die mutagenisierten Organismen gegenüber dem Wildtyp von *Paenibacillus pabuli* M1 eine deutlich gesteigerte lipolytische Aktivität exprimierten (Sczesny, mündliche Mitteilung).

Die Makrorestriktionsanalyse (3.8 und 4.10) hatte ergeben, daß der Anstieg der lipolytischen

Aktivität nicht auf das Vorhandensein von Tandem-Duplikationen im Genom der untersuchten Organismen zurückzuführen war.

Auch die Anfertigung einer Genbibliothek mit einer anschließenden Sequenzierung der vorliegenden funktionellen Gene ließ erkennen, daß diese keine Mutationen aufwiesen (Abb. A9).

Die Ermittlung der Sequenzen setzte weiterhin voraus, bestimmte Bereiche der vorliegenden Gene mehrfach zu analysieren. An Position 11 des vorliegenden Esterase-Gens hatte sich zunächst eine Veränderung ergeben, die als ein mögliches Mutationsereignis, basierend auf vermuteter *Mikroheterogenität* von mutierten und Wildtypzellen innerhalb einer Kolonie, interpretiert werden konnte. Eine erneute Analyse dieses Bereiches mittels eines anderen Sequenzier-Systems ergab allerdings, daß keine Veränderung vorlag und auch die mutagenisierten Stämme an dieser Position ein Adenin wie der Wildtyp-Stamm aufwiesen. Es ist bekannt und kann als eine Erklärung für das beobachtete Phänomen betrachtet werden, daß die Laser-abhängige Aufzeichnung der Signale am Beginn einer Nukleinsäure-Sequenz, nahe der Primer-Bindungsstelle, erheblichen Schwankungen unterliegt und aus diesen Gründen, die Auswertung der Daten in diesen Bereichen erschwert (Spöer, mündliche Mitteilung).

Die gesteigerte Expression lipolytischer Aktivität der mutagenisierten Stämme gegenüber dem Wildtyp müßte anhand der vorliegenden Daten also an anderer Stelle zu suchen sein. Als eine eventuelle Ursache könnte, wie bereits diskutiert, z.B. die Ausschaltung extrazellulärer proteolytischer Aktivität, betrachtet werden. Des weiteren könnte eine Veränderung der Promotorbereiche zu einer gesteigerten Bindungseffizienz der RNA-Polymerase führen und in dieser Form dazu beitragen, die Expression der untersuchten Enzyme zu erhöhen (Glick und Pasternak, 1995).

Auch der Translations-Startpunkt, die Ribosome Binding Site, könnte als weiterer Angriffspunkt für die beobachtete Steigerung der lipolytischen Aktivität betrachtet werden. Man geht im allgemeinen davon aus, daß je stärker die Bindung der ribosomalen RNA an die mRNA ist, desto größer erweist sich auch die Effizienz der Translationsinitiation. Allerdings konnten Translationsstartpunkte, wie sie von *E. coli* bekannt sind, bei *Paenibacillus pabuli* M1 nicht nachgewiesen werden. Weiterhin ist bekannt, daß Unterschiede in der Translationseffizienz der Zellen dafür verantwortlich sind, daß von einigen Proteinen wenige von anderen hingegen mehrere Hundert Kopien vorliegen (Glick und Pasternak, 1995).

Letztendlich sind sehr viele Mechanismen auf dem Weg vom Strukturgen zum reifen Protein

beteiligt und von diesen zahlreichen Möglichkeiten können aufgrund der vorliegenden Untersuchungen das Vorkommen von chromosomalen Tandem-Duplikationen und Veränderungen in der Gensequenz ausgeschlossen werden.

5. Zusammenfassung

Esterasen und Lipasen besitzen gemeinsam die Fähigkeit, Fettsäuren aus Triglycerid-Molekülen zu spalten. In diesem Zusammenhang werden auch eine große Anzahl von Bakterien als *lipolytisch-aktive* Organismen beschrieben. Dazu gehört u.a. der in dieser Arbeit untersuchte Vertreter der Art *Paenibacillus pabuli*.

Die Durchführung mikrobiologischer Nachweisverfahren hatte zu der Beobachtung geführt, daß *Paenibacillus pabuli* M1 lipolytisch-aktive Enzyme extrazellulär anhäuft und außerdem war aufgefallen, daß die verwendeten Medien sehr unterschiedliche Ergebnisse lieferten. Aber erst die Entwicklung eines biochemischen Assays, das die Aktivität extrazellulärer Enzyme im Kulturüberstand detektierte, lieferte einen Eindruck über die Diversität der Enzyme bezüglich der umgesetzten Substrate, wodurch die in der Literatur sehr widersprüchlichen Angaben über Lipase- und Esterase-Aktivitäten sowie generell über das Vorliegen solcher Enzyme erklärt werden konnten. Es wurden Enzymkinetiken unter Verwendung eines sehr breit angelegten Substratspektrums von Fettsäuren (C4:0 bis C18:1) durchgeführt. Daraus ließen sich Aktivitätsprofile erstellen, die deutlich den Umsatz bestimmter Fettsäuren veranschaulichten (Abb. 30, 31) und es konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei dem lipolytisch-aktiven Enzym aus *Bacillus licheniformis* DSM 13^T eindeutig um eine *echte* Esterase handelte, während die Aktivitätsprofile aus *Candida rugosa* und *Staphylococcus aureus* DSM 20714^T auf das Vorliegen von *echten* Lipasen hinwiesen. Die Aktivitätsmuster von *Paenibacillus pabuli* M1 und *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090^T entzogen sich einer derart exakten Zuordnung. Die untersuchten Enzyme waren in der Lage, ein verhältnismäßig breites Substratspektrum im kurz- und mittelkettigen Bereich umzusetzen. Damit konnte das biochemische Potential der vorliegenden Esterase aus *P. pabuli* M1 im Vergleich zu anderen Organismen relativ umfassend charakterisiert werden.

Die Anfertigung einer Genbibliothek lieferte anschließend die Nukleinsäure-Sequenz des zuvor charakterisierten Esterase-Gens. Es weist eine Länge von 1134 Basen auf, beginnt mit dem Start-Codon ATG an Position +1 und endet mit einem Stop-Codon an Position +1134. Das translatierte Protein erreicht eine Länge von 377 Aminosäuren. Daraus ließ sich ein Molekulargewicht von 41.659 Dalton und ein isoelektrischer Punkt von 5.37 ableiten. Das am nächsten verwandte Enzym, das mit einer Beschreibung seiner Funktion in den Datenbanken vorliegt, ist eine Transesterase aus *Mycobacterium tuberculosis*. Die Esterase aus *Paenibacillus pabuli* M1 besitzt in der N-terminalen Region ein konserviertes Motiv, bestehend aus den Aminosäuren S-M-T-K. Dieses charakterisiert das vorliegende Enzym als

Vertreter der Familie VIII von Jaeger *et al.* (1999), in der ausschließlich Esterasen zusammengefaßt werden. Außerdem befindet sich in der C-terminalen Region ein Tripeptid (RGD), dessen Vorkommen bei zahlreichen membrangebundenen Enzymen beschrieben wird. Weitere Daten deuteten ebenfalls daraufhin, das es sich bei der Esterase aus *Paenibacillus pabuli* M1 um ein membrangebundenes Enzym handelt, das konstitutiv gebildet wird, keiner Katabolit-Repression durch Glucose unterliegt und dessen Gen durch einen relativ schwachen Promotor kontrolliert wird. Signifikant in diesem Zusammenhang erscheint auch der Umstand, daß die Fettsäuren, die die untersuchte Esterase aus Triglyceriden spaltet, von *Paenibacillus pabuli* M1 als Natrium-Salze aerob abgebaut werden und es ist davon auszugehen, daß eine Spezialisierung des Organismus auf Fettsäuren einer Länge zwischen C₄ bis C₁₀ vorliegt.

UV- und NTG-Mutagenisierungen an dem Wildtyp von *Paenibacillus pabuli* M1 bewirkten eine gesteigerte lipolytische Aktivität und daraufhin wurden diese mutagenisierten Stämme durch Makrorestriktionsanalyse auf das Vorhandensein von Tandem-Duplikationen in ihren Genomen untersucht. Diese ließen sich nicht nachweisen. Die mutagenisierten Stämme zeigten auch innerhalb der sequenzierten Esterase-Gene im Vergleich zum Wildtyp von *Paenibacillus pabuli* M1 keine Veränderungen.

6. Literaturverzeichnis

- Alford, J.A. und D.A. Pierce** (1963). Production of microbial lipase by *Pseudomonas fragi* in a synthetic medium. *J. Bacteriol.* **86**: 24-29.
- Anderson, M. und H. McCarty** (1972). Rapid and sensitive assay for free fatty acids using rhodamine 6G. *Anal. Biochem.* **45**: 260-270.
- Anderson, R.P.** (1980). Microbial Lipolysis at Low Temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 36-40.
- Anderson, R.P., C.B. Hedlung und U. Jonsson** (1979). Thermal inactivation of a heat-resistant lipase produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *J. Food Sci.* **46**: 573-588.
- Anderson, R.P. und J.R. Roth** (1977). Gene duplication in bacteria: Alteration of gene dosage by sister-chromosome exchanges. *Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology* **43**: 1083-1087.
- Anderson, R.P. und J.R. Roth** (1977). Tandem genetic duplication in phage and bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**: 473-505.
- Anderson, R.P. und J.R. Roth** (1978). Tandem chromosomal duplications in *Salmonella typhimurium*: Fusion of histidine genes to novel promoters. *J. Mol. Biol.* **119**: 147-166.
- Arpigny, J.L. und K.E. Jäger** (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification und properties. *J. Biochem.* **343**: 177-183.
- Arbeit, R.D., M. Arthur, R.D. Dunn, C. Kim, R.K. Selander und R. Goldstein** (1990). Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology. *J. Infect. Dis.* **161**: 230-235.
- Arima, K., G. Tamura und T. Narasaki** (1967). Studies of the lipoprotein lipase of microorganisms. *Agr. Biol. Chem.* **31**: (8) 924-929.
- Ash, C., J.A. Farrow, S. Wallbanks und M.D. Collins** (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microb.* **13**: 202-206.
- Ash, C., F.G. Priest und M.D. Collins** (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**: 253-260.
- Banchio, C. und H.C. Gramajo** (1997). Medium- and long chain fatty acid uptake and utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2): first characterization of a Gram-positive bacterial system. *Microbiology* **143**: 2439-2447.
- Bascomb, S.** (1987). Enzyme Tests in Bacterial Identification. In: *Methods of Microbiology* **19**: 105-159.
- Beer, H.D.** (1995). Untersuchung der Lipase aus *Rhizopus oryzae* auf molekularer Ebene: Das Gen, der Reaktionsmechanismus und die Funktion der Prosequenz. Dissertation an der Universität Hannover.

- Beltan, P., S.A. Plock, N.H. Smith, T.S. Whitam, D.C. Old und R.K. Selander** (1991). Reference collection of strains of the *Salmonella typhimurium* complex from natural sources. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 601-606.
- Bertram, S. und H.G. Gassen** (1991). Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsmethoden für das molekularbiologische Labor. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. Jena. New York.
- Beverley, S.M.** (1989). Estimation of circular DNA size using gamma-irradiation and pulsed field gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **177**: 110-114.
- Beyer, H. und W. Walter** (1981). Lehrbuch der organischen Chemie. S. Hirzel Verlag, Stuttgart.
- Birnboim, H.C. und J. Doily** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1522.
- Björkeling, F., S.E. Godtfredsen und O. Kirk** (1991). The future impact of industrial lipases. *TIBTECH* **9**: 360-363.
- Black, P.N., S.F. Kianian, C.C. DiFusso und W.D. Nunn** (1985). Long-chain fatty acid transport in *Escherichia coli*. Cloning, mapping, and expression of the *fadL* gene. *J. Biol. Chem.* **260** (3): 1780-1789.
- Bligh, E.G. und W.J. Dyer** (1959). A Rapid Method of Lipid Extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917.
- Blazevic, D.J. und G.M. Ederer** (1975). Principles Of Biochemical Tests In Diagnostic Microbiology. John Wiley & Sons. New York, London, Sidney, Toronto. 23-36.
- Bloquel, R. und L. Veillet-Ponchet** (1984). Factors Contributing To Production Of Microbial Lipases. *Microb. Alim. Nutr.* **2**: 179-184.
- Brady, L., A.M. Brzozowski, Z.S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J.P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Høge-Jensen, L. Nørskov, L. Thim und U. Menge** (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**: 767-770.
- Breuil, C. und D.J. Kushner** (1975). Lipase and esterase formation by psychrophilic and mesophilic *Acinetobacter* sp. *Can. J. Microbiol.* **21**: (4) 423-433.
- Brockerhoff, H. und R. Jensen** (1974). Lipolytic enzymes. Academic Press. New York, San Francisco, London. 174ff.
- Brune, K.A. und F. Götz** (1992). Degradation of Lipids by Bacterial Lipases. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge **9**: 243-266.
- Carlton, B.C. und B.J. Brown** (1981). Gene mutation. In: Gerhardt, P. et al. (Hrsg.). Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington. 222-242.
- Chander, H., B. Ranganathan und J. Singh** (1979). Purification and some properties of lipase from *Streptococcus faecalis*. *J. Food Sci.* **44**: 1747-1751.
- Chu, G., D. Vollrath und R.W. Davis** (1986). Separation of Large DNA-Molecules by Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields. *Science* **234**: 1582-1585.
- Cantor, C.R., C.L. Smith und M.K. Matthew** (1988). Pulsed-field gel electrophoresis of

- very large DNA-molecules. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **17**: 287-304.
- Cooper, T.G.** (1980). Biochemische Arbeitsmethoden. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Crow, J.F., S. Abrahamson, C. Denniston, D.G. Hoel, E. Hubermann, P.N. Magee, D.W. Nebert, T. Roderick, M.W. Shaw, F. Sherman, V.F. Simmons, H.E. Sutton, S. Wolff und M.W. Drake** (1983). Identifying and estimating the genetic impact of chemical mutagens. National Academy Press, Washington DC.
- Cruz, H., C. Perez, E. Wellington, C. Castro und L. Servin-Gonzalez** (1994). Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family. *Gene* **144**: 141-142.
- Cutchins, E.C., R.N. Doetsch und M.J. Pelczar, jr.** (1951). The Influence of Medium Composition on the Production of Bacterial Lipases. *J. Bacteriol.* **63**: 269-272.
- Detering, K.** (1995). Untersuchung der mikrobiologischen Komponente eines biologischen Reinigungsmittels mit physiologischen, chemotaxonomischen und molekularbiologischen Methoden. Diplomarbeit. Technische Universität Braunschweig.
- Dimpfl, J. und H. Echols** (1989). Duplication mutation as an SOS response in *Escherichia coli*: enhance duplication formation by a constitutively activated *RecA*. *Genetics* **123**: 255-260.
- Dimri, G.P., K.E. Rudd, M.K. Morgan, H. Bayat und F.L. Ames** (1992). Physical mapping of repetitive extragenic palindromic sequences in *Escherichia coli* and phylogenetic distribution among *Escherichia coli* strains and other enteric bacteria. *J. Bacteriol.* **174**: 4583-4593.
- Drake, J.W.** (1989). Mechanisms of mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* **14**: 11-15.
- Driessen, F.M. und J. Stadhouders** (1974). Thermal activation and inactivation of exocellular lipases of some Gram-negative bacteria common in milk. *J. Neth. Milk Dairy.* **28**: 10-22.
- Edlund, T. und S. Nomark** (1981). Recombination between short DNA homologies causes tandem duplications. *Nature* **292**: 269-271.
- Eggstein, M. und F.H. Kreutz** (1966). Enzymatic determination of neutral fats in blood serum. *Klin. Wochensh.* **44**: 262-267.
- Engel, K.H., M. Bohnen und M. Dobe** (1991). Lipase-catalyses reactions of chiralhydroxyacids: esterfication and transesterfication. *Enzyme Microbiol. Technol.* **13**: 655-659.
- Eskin, E. und P. Pevzner** (2002). Genome-Wide Analysis of Bacterial Promotor Regions. *Bioinformatics* **15**: 563-577.
- Færgeman, N.J., C.C. DiRusso, A. Elberger, J. Knudsen und P.N. Black** (1997). Disruption of the *Saccaromyces cerevisiae* Homologue to the Murine Fatty Acid Transport Protein Impairs Uptake as Growth on Long-chain Fatty acids. **272**: 8531-8538.
- Finnerty, R.W.** (1989). Microbial lipid metabolism. In: C. Ratledge und S. G. Wilkinson (Hrsg.). Microbial Lipids **2**: 525-558.
- Franken, S.M., H.J. Rozeboom, B.W. Dijkstra** (1991). Crystal structure of haloalkane

- dehalogenase: an enzyme to detoxify halogenated alkanes. *EMBO J.* **10**: 1297-302.
- Gemmil, R.M.** (1991). Pulsed field gel electrophoresis. *Adv. Electrophoresis* **4**: 1-48.
- Glick, B.R. und J.J Pasternak** (1995). Molekulare Biotechnologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Godfredsen, S.E.** (1989). Microbial Lipases. In: Microbial Enzymes and Biotechnology. Elsevier Applied Science Publishers. **7**: 255-274.
- Godfrey, T. und S. West** (1996). Industrial Enzymology: The Application of Enzymes in Industry. New York: Stockton. 2nd Edition. 512ff.
- Gomori, G.** (1954). Chromogenic substrates for aminopeptidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **87**: 559-561.
- Goodenough, P.W., K.M. Bhat, M.E. Collins, B.N. Perry, R.W. Pickersgill, I.G. Summer, J. Warwicker, G.H. De Haas und H.M. Verheij** (1991). Changes in activity of porcine phospholipase A₂ brought about by charge engineering of a major structural element to alter stability. *Protein Eng.* **4**: 929-934.
- Grothues, D., W. Bautsch und B. Tümmmler** (1990). Analysis of large DNA-molecules by field inversion gel electrophoresis. In: Greenaway, J.P. (Hrsg.). *Advances in Gene Technology* Vol. 1, JAI Press, London, 73-97.
- Grothues, D., U. Römling und B. Tümmmler** (1991). Technik und Anwendung der Makrorestriktionsanalyse in der Mikrobiologie. *Bioforum* **10**: 360-369.
- Guilbault, G.G.** (1976). Handbook of enzymatic methods of analysis. In: M.K. Schwartz (Hrsg.). Clinical and Biochemical Analysis Vol. 4. Marcel Dekker, New York, Basel 139-143.
- Gunstone, F.D.** (1989). Oils and Fats-past, present and future. In: R. C. Cambie (Hrsg.) Fats for the Future. Ellis Horwood Ltd, Chichester. 1-16.
- Haslbeck, F., F. Senser und W. Grosch** (1985). Nachweis niedriger Lipase-Aktivitäten in Lebensmitteln. *Int. J. Food Res. Techn.* **181**: 271-275.
- Heath, J.D.** (1992). Control of chromosomal rearrangements in *Escherichia coli*. Ph.D. Thesis. University of Texas Health Science Center at Houston.
- Heath, J.D., G.M. Weinstock** (1991). Tandem duplication of the *lac* region of the *Escherichia coli* chromosome. *Biochemistry* **73**: 343-352.
- Hill, C.W. und R.H. Cambriato** (1973). Genetic duplications induced at very high frequency by ultraviolet irradiation in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **127**: 197-214.
- Hill, C.W., R. Grafstrom, B.W. Harnish, B.S. Hillman** (1977). Tandem duplications resulting from recombination between ribosomal RNA genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **116**: 407-428.
- Hoffman, G.R., R.W. Morgan, R.C. Harvey** (1978). Effects of chemical and physical mutagens on the frequency of a large genetic duplication in *Salmonella typhimurium* I. Induction of duplications. *Mutat. Res.* **52**: 73-80.
- Holdeman L.V., E.P. Cato und W.E.C. Moore** (Hrsg., 1977). Anaerobe laboratory

- manual, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- Holloway, B.W., M.D. Escuarta, A.F. Morgan, R. Saffery und V. Krishnapillai** (1992). The new approaches to whole genome analysis of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**: 101-105.
- Horiuchi, R., S. Horiuchi, A. Novick** (1963). The genetic basis of hypersynthesis of β -galactosidase. *Genetics* **48**: 157-169.
- Horiuti, Y. und S. Imamura** (1978). Stimulation of *Chromobacterium* lipase activity and prevention of its adsorption to palmitoyl cellulose by hydrophobic binding of fatty acids. *J. Biochem.* **83**: 1381-1385
- Huss, H.** (1908). Eine fettsplattende Bakterie (*Bactridium lipolyticum* n. sp.). *Zentr. Bakt. Parasitenkr. II.* **20**: 474-484.
- Inoune, S., K. Yamamoto und S. Kawanishi** (1990). DNA damage induced by metabolites of o-phenylphenol in the presence of copper(II)ion. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, **2**: 144-149.
- Jaeger, K.E., B.W. Dijkstra und M.T. Reetz** (1999). Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures and Biotechnological Applications of Lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 315-351.
- Jaeger, K.E., S. Wohlfarth und U. Winkler** (1991). Lipases. In: *GBF Monographs*. Verlag Chemie. Weinheim/ Bergstr.
- Jensen, R.G.** (1983). Purification of Triglycerides with an Alumina Column. *Lipids* **1**, **6**: 451-452.
- Jonsson U. und B.G. Snygg** (1974). Lipolytic microorganism in cold stored food. *Chem. Mikrobiol. Techn. Lebensm.* **3**: 76-80 und **4**: 113-118.
- Joris, B., J.M. Ghuysen, G. Dive, A. Renard, O. Dideberg, P. Charlier, J.M. Frere, J.A. Kelly, J.C. Boyington, P.C. Moews und J.R. Knox** (1998). The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the Streptomyces R61 DD-peptidase family. *J. Biochem.* **250**: 313-324.
- Karlson, P.** (1984). Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Keay, L.** (1972). Proteases of the Genus *Bacillus*. *Ferment. Technol. Today.* 289-298.
- Kennedy, M.B. und W.J. Lennarz** (1979). Characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* and its relationship to a membrane-bound lipase found in a mutant strain. *J. Biol. Chem.* **254**: 1080-1089.
- Kibler, D. und S. Hampson** (2001). Characterizing the Shine-Dalgarno Motif: Probability Matrices and Weight Matrices. *METMBS.* 208-214.
- Kohlwein, S.D., G. Daum, E. Zinser und F. Paltauf** (1983). Effect of Inositol Starvation on Glycerolipid Metabolism in *Saccharomyces uvarum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **792**: 310-318.
- Kommission der Europäischen Gemeinschaften** (1988a). Richtlinie des Rates über die absichtliche Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen in die Umwelt. KOM (88). 160-SYN 131.

- Kommissioin der Europäischen Gemeinschaften** (1988b). Richtlinienentwurf über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit. KOM(88) 165-endg. verabschiedet durch den Deutschen Bundestag, Bundestags-Drucksache 11/4760.
- Kouker, G. und K.E. Jaeger** (1987). Specific und Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 211- 213.
- Kroll, J.** (1994). Lipasen. In: Industrielle Enzyme. B. Behr's Verlag GmbH & C. Hamburg. 832-842.
- Kumar, G.B. und P.N. Black** (1991). Linker Mutagenesis of a Bacterial Fatty Acid Transport Protein. *J. Biolog. Chem.* **266**: 1348-1353.
- Kumar, G.B. und P.N. Black** (1993). Bacterial Long-chain Fatty Acid Transport. *J. Biolog. Chem.* **268**: 15469-15476.
- Lawrence, R.C., T.F. Fryer und B. Reiter** (1967). The production and characterization of lipases from *Micrococcus* and *Pseudomonas*. *J. Gen. Microbiol.* **48**: 401-408.
- Liao, D.I., K. Breddam, R.M. Sweet, T. Bullock und S.J. Remington** (1992). Refined atomic model of wheat serine carboxypeptidase-II at 2.2-Ångstrom resolution. *Biochemistry* **31**: 9796-9812.
- Lima N., J.A. Teixeira und M. Mota** (1991). Deep Agar-diffusions Test for Preliminary Screening of Lipolytic Activity of Fungi. *J. Microbiol. Methods* **14**: 193-200.
- Little, C.** (1981). Phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Methods Enzymol.* **71**: 725-730.
- Lobyreva, L.B. und A.I. Marchenkowa** (1979). Lipolytic activity of the spore-forming strain of *Bacillus subtilis*. *Mikrobiologiya* **48**: 208-211.
- Lowry, O.H.** (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
- Lu, J.Y. und B.J. Liska** (1969). Lipase from *Pseudomonas fragi*. I: Purification of the enzyme. *Appl. Microbiol.* **18**: 108-113.
- Macrae, A.R.** (1983). Lipase-catalyses interesterifications of oils and fats. *J. Am. Oil Soc.* **60**: 291-294.
- Macrae, A.R. und R.C. Hammond** (1985). Present and future applications of lipases. *Biotechn. Gen. Eng. Rev.* **3**: 193-294.
- Maloy, S.R., C.L. Ginsburgh., R.W. Simmons und W.D. Nunn** (1981). Transport of long chain fatty acids by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **256**: 3735-3742.
- Maniatis, M., E.F. Fritsch und J. Sambrock** (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Marshall, R.** (1992). Standard Methods For The Examination Of Dairy Products. American Public Health Association, Washington. 276-277.
- Mates, A. und D. Sudakevitz** (1973). Production of lipase by *Staphylococcus aureus* under various growth conditions. *J. Appl. Bacteriol.* **36**: 219-226.
- McClelland, M., R. Jones, Y. Patel und M. Nelson** (1987). Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **15** (15): 5985-6005.

- McKellar, R.** (1986). A rapid colorimetric assay for the extracellular lipase of *Pseudomonas fluorescens* B52 using β -naphthyl-caprylate. *J. Dairy Res.* **53**: 117-127.
- McNeill, G.P., S. Shimizu und T. Yamane** (1991). High-yield enzymatic glycerolysis of fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**: 1-8.
- Merck Handbuch** (1996). Merck KGaA, Darmstadt.
- Miles, R., E.L.T. Siu, C. Carrington, A.C. Richardson, B.V. und R.G. Price** (1992). The Detection of Lipase Activity in Bacteria Using Novel Chromogenic Substrates. *FEMS Microbiol. Lett.* **90**: 283-288.
- Miller, Jeffrey H.** (1992). A Short course in bacterial genetic. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Moss, C.W., P.L. Wallace, D.G. Hollis und R.E. Weaver** (1988). Cultural and chemical characterization of CDC groups EO-2, M-5, and M-6 *Moraxella* (*Moraxella*) species, *Oligella urethralis*, *Acinetobacter* species, and *Psychrobacter immobilis*. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 484-492.
- Mukherjee, K.D.** (1990). Lipase-catalyses reactions for modification of fats and other lipids. *Biocatalysis* **3**: 277-293.
- Näher, G.** (1970). In: H.U. Bergmeyer. Methoden der Enzymatischen Analyse. **1**: 781-791. Verlag Chemie, Weinheim/ Bergstr.
- Nadkarni, S.R.** (1968). Studies on bacterial lipase. Nutritional requirement of *Pseudomonas aeruginosa* for production of lipase. *Enzymology* **40**: 286-301.
- Nakamura, L. K.** (1984). *Bacillus amylyticus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus lautus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus pabuli* sp. nov., nom. rev., und *Bacillus validus* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 224-226.
- Nashif, S.A. und F.E. Nelson** (1970). Production of blue flavor via submerged fermentation by *P. roquefortii*. *J. Agric. Food Chem.* **18**: 567.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak und G.v. Heijne** (1997). Identification of procaryotic and eucaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **1**: 1-6.
- Nishioka, T., M. Chihara-Shiomi, K. Yoshikawa, M. Inagaki, Y. Yamamoto, J. Hiratake, N. Baba und J. Oda** (1991). Lipase from *Pseudomonas* spec. In: L. Alberghina. R. Verger und R. D. Schmidt (Hrsg.) Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering, GBF Monographs **16**: 253-262. VCH, Weinheim.
- Nunn, W.D., R.W. Simons, P.A. Egan und S.R. Maloy** (1979). Kinetics of the Utilization of Medium and Long Chain Fatty Acids by a Mutant of *Escherichia coli* in the *fadL* Gene. *J. Biol. Chem.* **254**: 9130-9134.
- Nunn, W.D.** (1986). A Molecular View of Fatty Acid Catabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **50**: 179-192.
- Ollis, D.L., E. Cheah, M.W. Cygler, B. Dijstraka, F. Frolow, S.M. Franken, M. Harel, S.J. Remington, I. Silman, J.D. Schrag, J.L.- Sussman, K.H. Verschuere und A. Goldman** (1992). The α/β -hydrolase fold. *Protein Engineering* **5** (3): 197-211.

- Osamu, D. und N. Shoshichi** (1974). Lipase activity of detergent resistant phospholipase A in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **369**: 64ff.
- Petes, T.D. und C.W. Hill** (1988). Recombination between repeated genes in microorganisms. *Ann. Rev. Genet.* **22**: 147-168.
- Peterson, G.L.** (1977). A Simplification of the Preotein Assay Method of *Lowry*. Which is More Generally Applicable. *Anal. Biochem.* **83**: 346.
- Präve, P., U. Faust, W. Sittig und D.A. Sukatsch** (Hrsg., 1987). Handbuch der Biotechnologie. R. Oldenbourg Verlag, München, Wien.
- Pascher, I.** (1996). The different conformations of the glycerol region of cristalline acylglycerols. *Curr. Opin. Stuct. Biol.* **6**: 439-48.
- Priest, F.G.** (1993). Systematics and ecology of *Bacillus*. In: L. Sonenshein, J.A. Hoch und R. Losick (Hrsg.). *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. American Society of Microbiology, Washington, D.C.: 3-16.
- Prim, N., A. Blanco, J. Martines, F.I.J. Pastor und P. Diaz** (2000). *estA*, a gene coding for a cell-bound esterase from *Paenibacillus* sp. BP-23, is a new member of the bacterial subclass of type B carboxylesterases. *Res. Microbiol.* **151**: 303-312.
- Rauhut, R.** (2001). Bioinformatik. Viley VCH GmbH, Weinheim. 9ff.
- Ratledge C.** (Hrsg., 1994). Biodegradation of oils, fats and fatty acids. In: Biochemistry of Microbial Degradation. Kluwer Academic Publishers: 89-141.
- Riley, M. und A. Aniolis.** (1978). Evolution of the bacterial genome. *Annu. Rev. Microbiol.* **32**: 519-560.
- Römmling, U., K. Schmidt und B. Tümmler** (1994). In: Bacterial Genomes. ITP International Thomson Publishing. 312-326.
- Rossmann, T.G.** (1989). On the mechanism of the comutagenic effect of Cu(II) with ultraviolet light. *Biol. Trace Elem. Res.* **21**: 383-388.
- Sakai, Y., J. Ishikawa, S. Fukasak, H. Yurimoto, R. Mitsui, H. Yanase und N. Kato** (1999). A new carboxylesterase from *Brevibacterium linens* IFO 12171 responsible for the conversion of 1,4-butanediol diacrylate from 4-hydroxy acrylat: purification, characterization, gene cloning and gene expression in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63** (4): 688-97.
- Sambrook, J. und D.W. Russel** (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. CSHL Press, Cold Spring Habor, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen und A.R. Coulsen** (1977). DNA Sequencing with Chain-Termination Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463-5467.
- Schlegel, H.G.** (1992). Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 277ff.
- Schwartz, D.C. und C.R. Cantor** (1984). Seperation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**: 67-75.
- Schweizer, E.** (1989). Biosynthesis of fatty acids and related compounds. In: C. Ratledge und

- S. G. Wilkinson (Hrsg.). Microbial Lipids **2**: 3-42.
- Szcesny, K. (1996). BioTec-Firmenportrait. *BioTec* **5**: 26
- Shelley, A.W., H.C. Deeth und I.C. Mac Rae (1987). Review of Methods of Enumeration, Detection and Isolation of Lipolytic Microorganisms with Special Reference to Dairy Applications. *J. Microbiol. Methods* **6**: 123-137.
- Sigma (1999). Katalog. Biochemikalien und Reagenzien für die Life Science Forschung. Deisenhofen.
- Sierra G. (1957). Studies on bacterial esterases. Part III: Influence on the composition of the culture media on the production of an esterase and lipase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie Leeuwenhoek* **23**: 278-288.
- Sonnet, P.E. und J.A. Gazzillo (1991). Evaluation of lipase selectivity for hydrolysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**: 11-15.
- Souci, W., W. Fachmann und H. Kraut (1986). Die Zusammensetzung der Lebensmittel Nährwert-Tabellen 1986/87. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Sugiura, M.T. und M. Isobe (1975). Studies on the lipase of *Chromobacterium viscosum* IV. Substrate specificity of a low molecular weight lipase. *Chem. Pharm. Bull.* **23**: 1226-1230
- Sugiura, M.T. und M. Isobe (1975). Effects on temperature and state of substrate on rate of hydrolysis of glycerides by lipases. *Chem. Pharm. Bull.* **23**: 681-682.
- Sugiura, M.T., T.Oikawa, K. Hirano und T. Inukai (1977). Purification, cristallization and properties of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *Biochim. Biophys. Acta* **488**: 353-358.
- Sugiura, M.T., T. Oikawa, K. Hirano, H. Maeda, H. Yoshimura, M. Sugiyama und T. Kuratsu (1977). A simple colorimetric method for determination of serum triglycerides with lipoprotein lipase and glycerol dehydrogenase. *Clin. Chem. Acta* **81**: 125-130.
- Sugiura, M.T. (1984). In: B. Borgström und H.L. Brockmann (Hrsg.). Lipases. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. **D**: 506-523.
- Sugihara, A., Y. Shimada und Y. Tominaga (1988). Purification and Charakterization of a *Aspergillus niger* Lipase. *Agric. Biol. Chem.* **52** (6): 1591-1592.
- Sussman, J.L., M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman (1988). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **253**: 872-79.
- Suzuki, M., H. Yamamoto und M. Mizugakui (1986). Purification and General Properties of a Metal-Intensive Lipase from *Rhizopus japonicus* NR 400. *J. Biochem.* **100**: 1207-1213.
- Stahl, E. (1967). Dünnschicht-Chromatographie. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Stead, D. (1983). A fluorimetric method for the determination of *Pseudomonas fluorescens* AR11 lipase in milk. *J. Dairy Res.* **50**: 491-502.

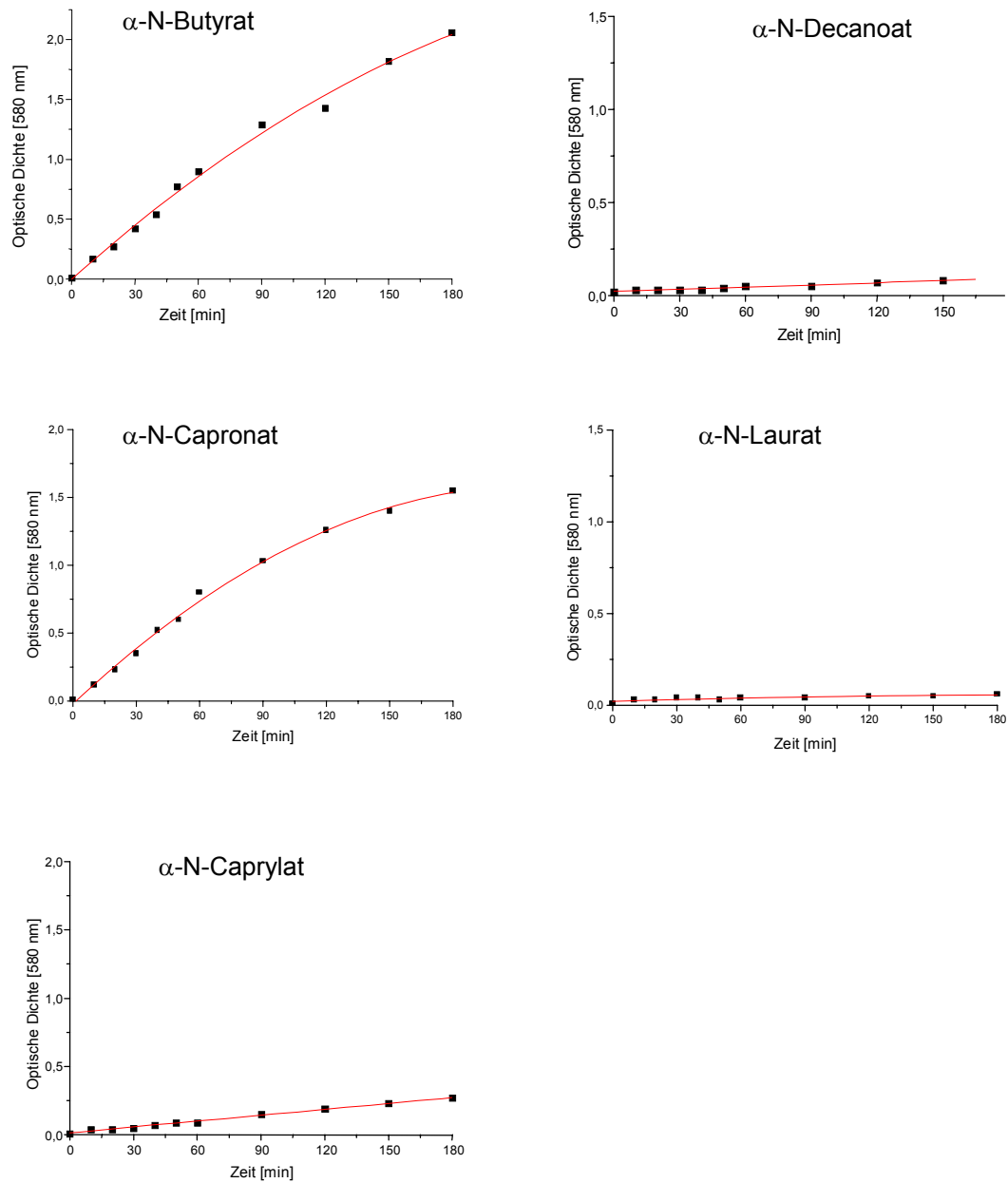
- Stead, D.** (1986). Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. *J. Dairy Res.* **53**: 481-505.
- Sztajer, H. und E. Zboinska** (1982). Microbial Lipases in Biotechnology. *Acta Biot.* **8**: 169.
- Sztajer, H., I. Maliszewska und J. Wieczorek** (1988). Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. *Enzyme und microbial Technology*. **10**: 492.
- Tanaka, T., E. Ono, M. Ishihara, S. Yamanaka und K. Takinami** (1981). Enzymatic Acyl Exchange of Triglyceride in *n*-Hexane. *Agricultural and Biological Chemistry* **45**: 2387.
- Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing und B. Swaminathan** (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2233-2239.
- Thornton, J., S.P. Howard und J.T. Buckeley** (1988). Molecular cloning of a phospholipid-cholesterol acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*. Sequence homologies with lecithin-cholesterol acyltransferase and other lipases. *Biochim. Biophys. Acta* **959**: 153ff.
- Touraine, F. und R. Drapon** (1988). Influence of water activity on glyceride and glycol ester synthesis by lipase from *Rhizopus arrhizus*. *J. Can. Inst. Food Sci. Technol.* **21**: 255-259.
- Trani, M., F. Ergun und G. Andre** (1991). Lipase-catalysed production of wax esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**: 20-22.
- Tsujiisakka, Y., M. Iwai und Y. Tominaga** (1973). Purification, Crystallization and Some Properties of Lipase from *Geotrichum candidum* Link. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 1457.
- Vasel, B., H. Hecht, R.D. Schmid und D. Schomburg** (1993). 3D-structures of the lipase from *Rhizomucor miehei* at different temperatures and computer modelling. *J. Biotechnol.* **28**: 99-105.
- Verger, R.** (1980). Enzyme kinetics of lipolysis. In: D. L. Purich (Hrsg.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, London, Toronto, San Francisco **64**: 340-392.
- Verger, R.** (1997). Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* **15**: 32-38.
- Voit, H., E. Wenzig und A. Mersmann** (1991). Production of a microbial lipase by *Staphylococcus carnosus* (pLipMut 2) in a bubble column reactor and a centrifugal field bioreaktor. *Bioproc. Engin.* **6**: 221-226.
- Vorderwülbecke, T., K. Kieslich und H. Erdmann** (1992). Comparison of lipases by different assays. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 631-639.
- Wagner, U., B. Sölkner, E.I. Petersen, A. Schlacher, H. Schwab und C. Kratk** (1997). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the *Pseudomonas margiata* esterase EstB. *Acta Cryst.* **D53**: 596-598.
- Wagner, U.G., E.I. Petersen, H. Schwab und C. Kratky** (2002). EstB from *Burgholderia gladioli*: a novel esterase with β -lactamase fold reveals steric factors to discriminate between esterolytic and beta-lactam cleaving activity. *Protein Sci.* **11** (3): 467-478.
- Watanabe, N., Y. Ota, Y. Minoda und K. Yamada** (1977). Isolation and identification of

- alkaline lipase producing microorganism, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 1353-1358.
- Weinstock, G.M.** (1994). In: Bacterial genomes: Mapping and stability. *ASM News* **60**: 73-78.
- Wilkinson, S.G.** (1988). Gram-negative bacteria. In: C. Ratledge and S.G. Wilkinson (Hrsg). Microbial lipids. Academic Press, London **1**: 299-488.
- Winkler, U.K. und M. Stuckmann** (1979). Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **138**, Nr.3: 663-670.
- Wong, C.H.** (1989). Enzymatic catalysts in organic synthesis. *Science* **244**: 1145-1152.
- Yamaguchi, S. und T. Mase** (1991). Purification and characterization of mono- and diacylglycerol lipase isolated from *Penicillium camembertii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 720-725.
- Yamamoto, K. und S. Kawanishi** (1991). Site-specific DNA-damage induced by hydrazine in the presence of manganese and copper ions. The role of hydroxyl radicals and hydrogen atoms. *J. Biol. Chem.* **266**, 3: 1509-1515.
- Yang, S.Y. und H. Schulz** (1983). The large subunit of the fatty acid oxidation complex from *Escherichia coli* is a multifunctional polypeptide. *J. Biol. Chem.* **258**: 9780-9785.
- Yang, S.Y., D. Cuebas und H. Schulz** (1986). Channeling of 3-hydroxy-4-trans-decenoyl coenzyme A on the bifunctional β -oxidation enzyme from a rat liver peroxisomes on the large subunit of the fatty acid oxidation complex from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **261**: 15390-15395.
- Zhihua, Y. und H. Xiuzhen** (1986). Formation and characterization of chain diacyl-CoA synthetase from *candida tropicalis*. *Acta Microbiol. Sinica* **26**: 333-340.

7. Anhang

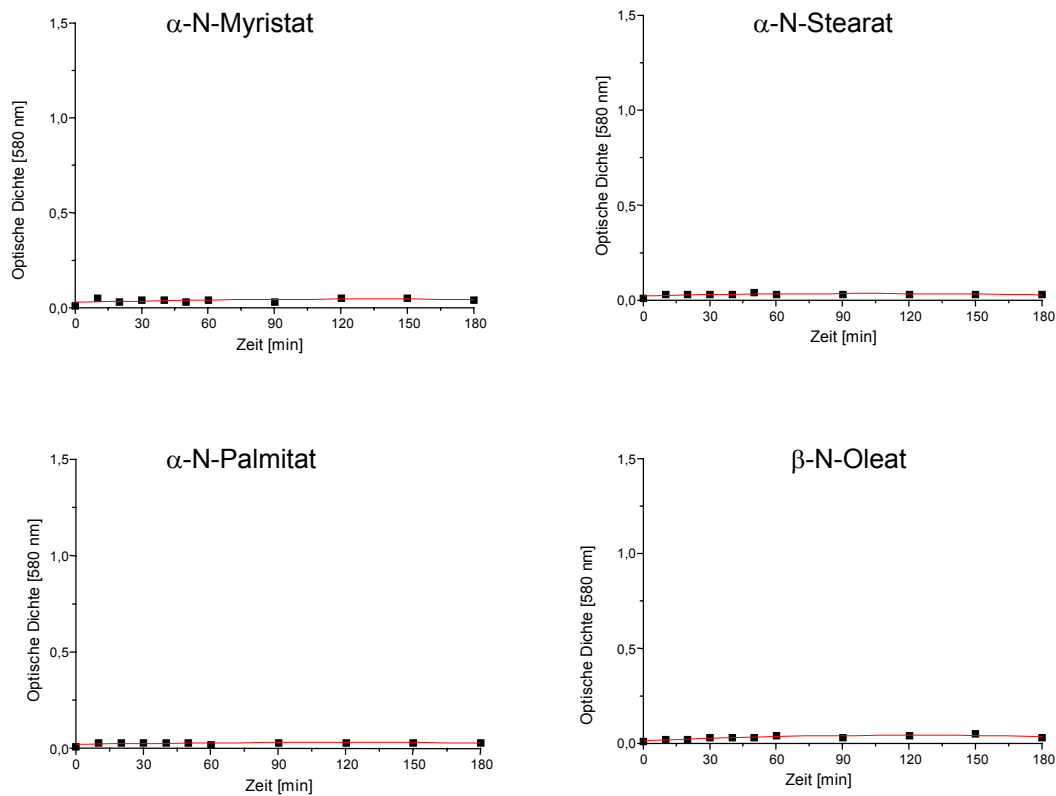
7.1 Abkürzungen

A	Adenin	M	Mol
Abb.	Abbildung	mM	Millimol
A. bidest.	bidestilliertes Wasser	Mb	Mega-Basenpaare (10 ⁶ bp)
A. demin.	demineralisiertes Wasser	MG	Molekulargewicht
B.	Bacillus	mg	Milligramm
BSA	Bovine Serum Albumin	μl	Mikroliter
Bp	Basenpaare	ml	Milliliter
C	Celsius	min	Minute
C	Cytosin	MO	Mikroorganismen
CASO	Casein-Sojapepton	N	Naphthyl
CHEF	Contour-Clamped Homogeneous Electric Field	NB	Nutrient Broth
C.I.	Colour Index	nm	Nanometer
C-Quelle	Kohlenstoff-Quelle	NTG	Nitrosoguanidin
d	day	OD	Optische Dichte
Da	Dalton	P.	Paenibacillus
DC	Dünnschicht-Chromatographie	p.A.	per Analysis
DIG	Digoxigenin	PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
DMSO	Dimethylsulfoxid	Ps.	Pseudomonas
DNA	Deoxyribonucleic Acid	pH	Wasserstoffionen-Konzentration
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	2PHP ₄₀	Pepton, Hefeextrakt, Phosphat, 2fach-konzentriert, Tween 40
DSM ^T	DSM Typ-Stamm	PIC	Protease Inhibitor Cocktail
DTT	Dithiothreitol	PSI	Pounds per Square Inch
E	Extinktion	RE	Restriktions-Endonuklease
E.	Escherichia	rpm	Rounds per Minute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RT	Raumtemperatur
erg	1 erg = 10 ⁻⁷ Joule	s	Sekunde
FP	Fleisch-Pepton	S.	Staphylococcus
FS	Fettsäure	SC	Säulenchromatographie
GC	Gaschromatographie	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
GC	Guanin-Cytosin-Gehalt	SE	Sarkosin-EDTA
G	Guanin	SL	Spurenelement-Lösung
g	Gramm	T	Thymin
g	Erdbeschleunigung	Tab.	Tabelle
h	Stunde	TBE	Tris, Borsäure, EDTA
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography	TE	Tris, EDTA
IS	Insertionssequenzen	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
IPTG	Isopropyl β-D-Thiogalactopyranoside	T _m	Schmelzpunkt
kb	kilo-Basenpaare (10 ³ bp)	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
KBE	Koloniebildende Einheiten	tBME	tertiärer Butylmethylether
k.D.	keine Daten	U	Unit
kDa	kilo-Dalton	u.a.	unter anderem
LB	Luria Bertani	UV	ultraviolett
		V	Volt
		(v/v) %	Volumenprozent
		w	weak, schwache Reaktion
		(w/w) %	Gewichtsprozent
		X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galacto-pyranoside
		z. A.	zur Analyse
		z. B.	zum Beispiel

7.2 *Bacillus licheniformis*: Kinetiken**Abb. A1.**

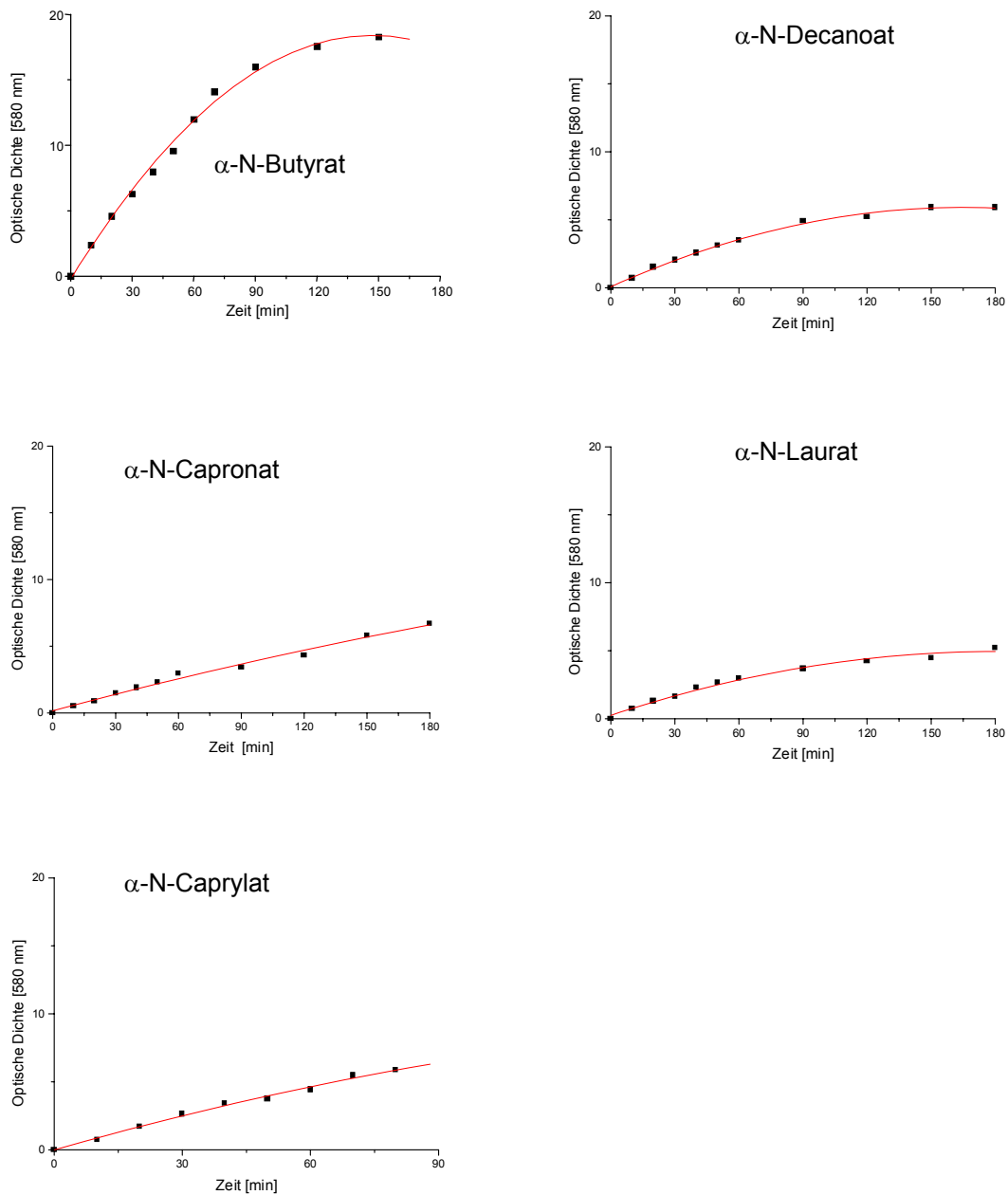
Enzym-Kinetiken für extrazelluläre lipolytische Enzyme aus dem Kulturüberstand von *Bacillus licheniformis*.

Die Darstellungen wurden unter Verwendung von α -N-Butyrat, -Capronat, -Caprylat, -Decanoat sowie -Laurat angefertigt und über einen Zeitraum von 180 min gemessen.

**Abb. A2.**

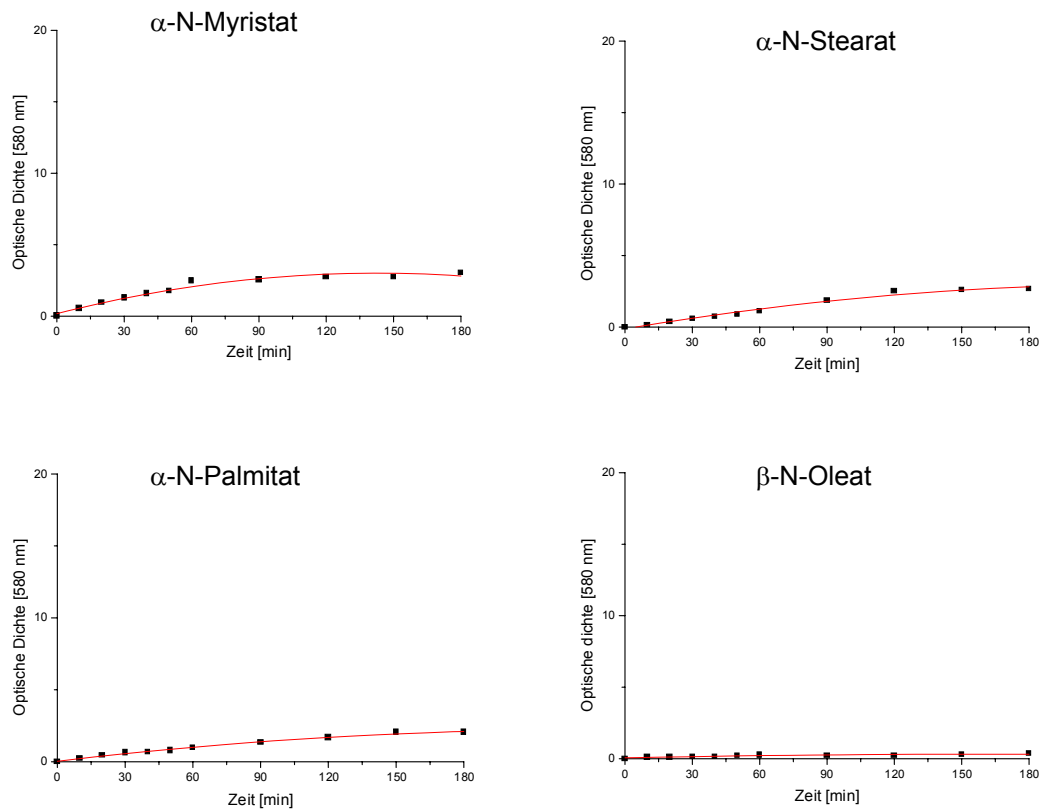
Kinetiken für extrazelluläre lipolytische Enzyme aus dem Kulturüberstand von *Bacillus licheniformis*.

Die Aktivitätsmessungen wurden unter Verwendung von α -N-Myristat, -Palmitat, -Stearat und -Oleat über einen Zeitraum von 180 Minuten angefertigt.

7.3 *Staphylococcus aureus*: Kinetiken**Abb. A3.**

Charakterisierung der lipolytischen Aktivität im Kulturüberstand von *Staphylococcus aureus*.

Die Darstellungen wurden unter Verwendung von α -N-Butyrat, -Capronat, -Caprylat, -Decanoat und -Laurat als Enzymsubstrate angefertigt.

**Abb. A4.**

Charakterisierung der lipolytischen Aktivität im Kulturüberstand von *Staphylococcus aureus*.

Die Aktivitätsmessungen wurden unter Verwendung von α-N-Myristat, -Palmitat, -Stearat und -Oleat über einen Zeitraum von 180 Minuten angefertigt.

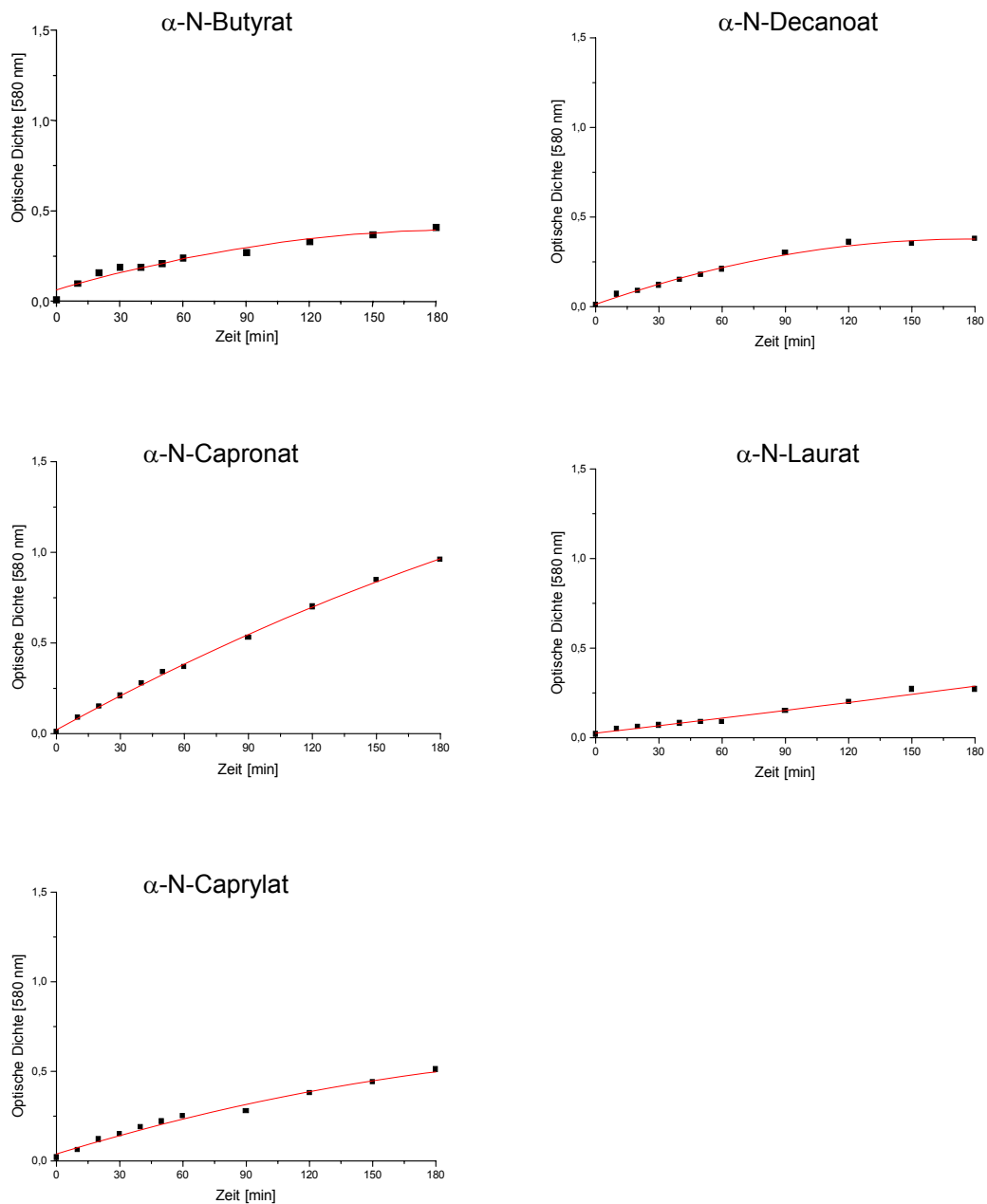
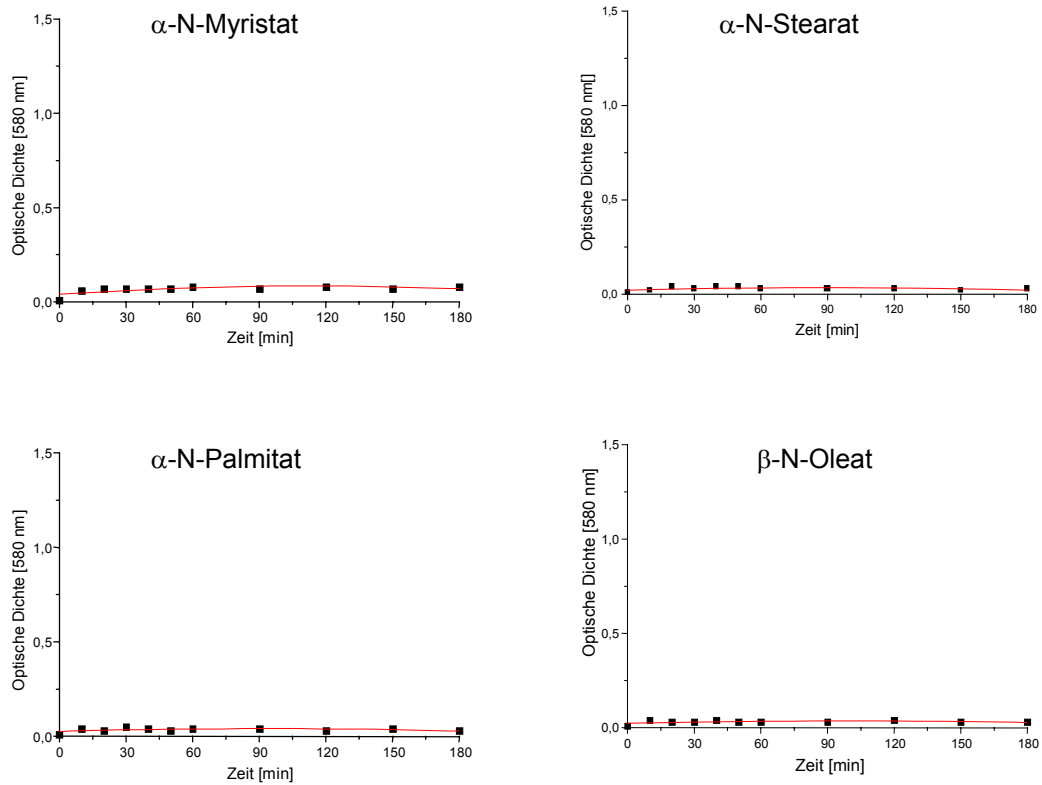
7.4 *Pseudomonas fluorescens*: Kinetiken

Abb. A5.
Charakterisierung der lipolytischen Aktivität im Kulturüberstand von *Pseudomonas fluorescens*.
Die Darstellungen wurden unter Verwendung von α-N-Butyrat, -Capronat, -Caprylat, -Decanoat und -Laurat als Enzymsubstrate angefertigt.

**Abb. A6.**

Charakterisierung der lipolytischen Aktivität im Kulturüberstand von *Pseudomonas fluorescens*.

Die Aktivitätsmessungen wurden unter Verwendung von α -N-Myristat, -Palmitat, -Stearat und -Oleat über einen Zeitraum von 180 Minuten angefertigt.

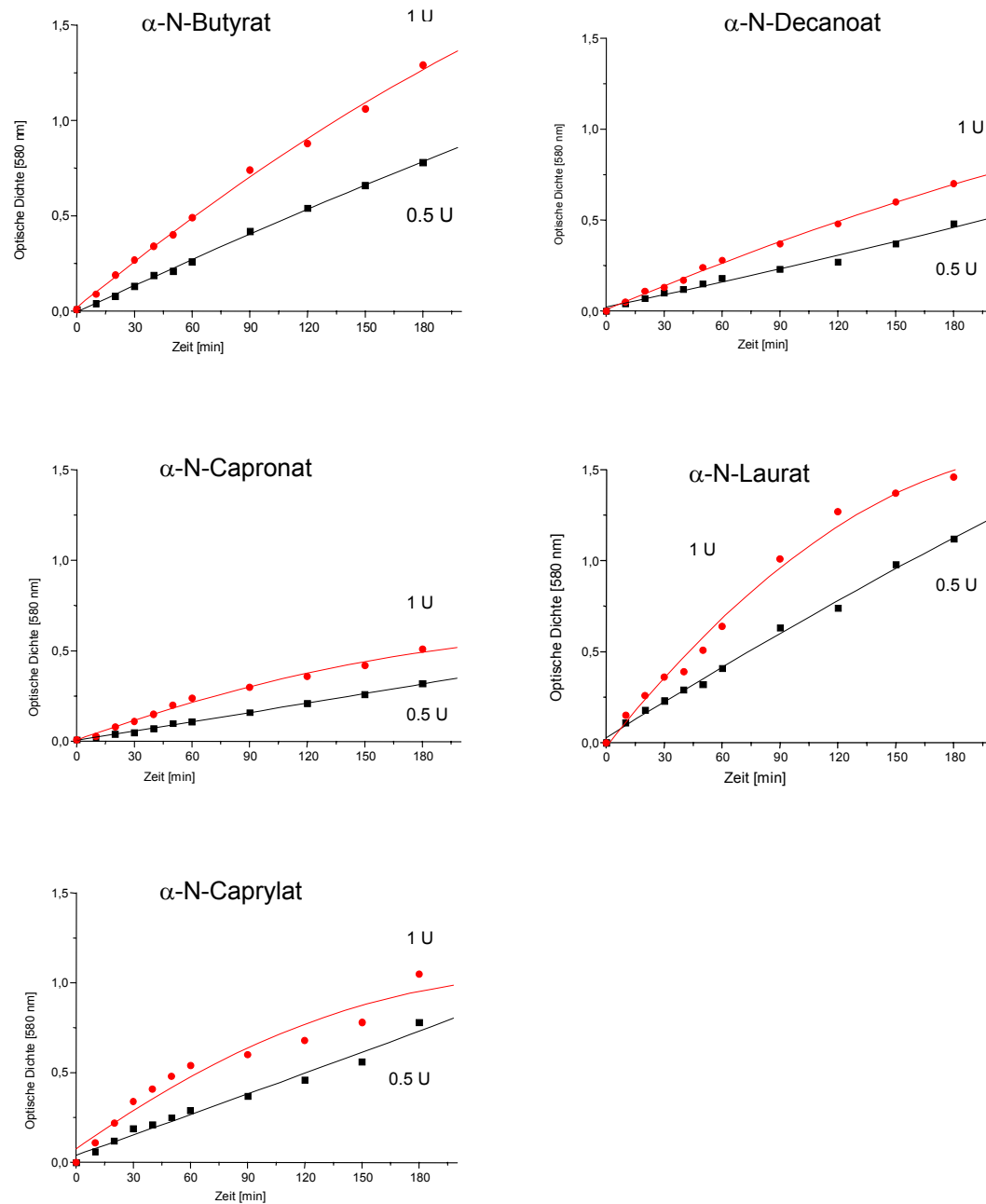
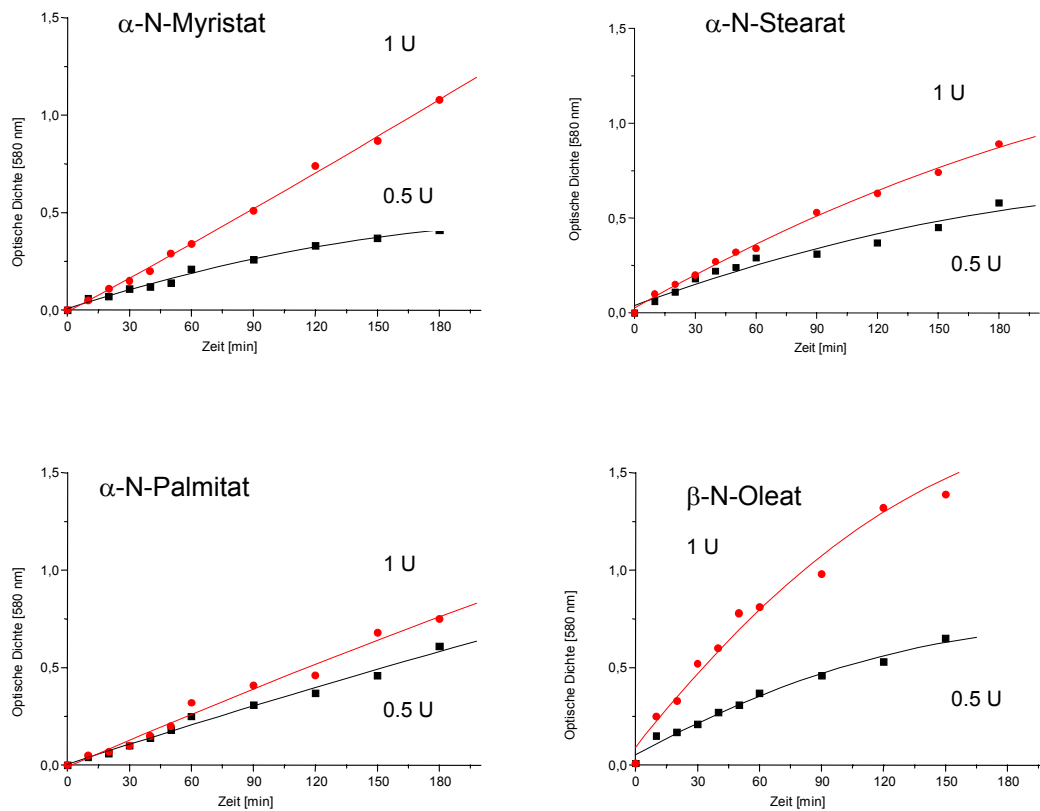
7.5 *Candida rugosa*: Kinetiken

Abb. A7.
Enzymkinetiken für eine Lipase aus *Candida rugosa*.

Die Darstellungen wurden unter Verwendung von α-N-Butyrat, -Capronat, -Caprylat, -Decanoat und -Laurat als Enzymsubstrate angefertigt. Die eingesetzten Enzym-Aktivitäten entsprachen:

rot: 1.0 Unit, **schwarz:** 0.5 Units.

**Abb. A8.****Kinetiken für eine Lipase aus *Candida rugosa*.**

Die Aktivitätsmessungen wurden unter Verwendung von α -N-Myristat, -Palmitat, -Stearat und -Oleat über einen Zeitraum von 180 Minuten angefertigt. Die eingesetzten Enzym-Aktivitäten entsprachen:

rot: 1.0 Unit, **schwarz:** 0.5 Units.

7.6 Alignment der Nucleinsäuresequenzen des Esterase-Gens aus *Paenibacillus pabuli* M1 und der Mutanten 34.7, 34.8, 34.16, 35.3 und 35.7

34.7	ATGGATTTTAAACCGCTTGCTTCATTATCGACCGCATCACTGCTTGGCG	50
35.7	ATGGATTTTAAACCGCTTGCTTCATTATCGACCGCATCACTGCTTGGCG	50
34.16	ATGGATTTTAAACCGCTTGCTTCATTATCGACCGCATCACTGCTTGGCG	50
34.8	ATGGATTTTAAACCGCTTGCTTCATTATCGACCGCATCACTGCTTGGCG	50
35.3	ATGGATTTTAAACCGCTTGCTTCATTATCGACCGCATCACTGCTTGGCG	50
<i>P.pabuli</i> M1	ATGGATTTTAAACCGCTTGCTTCATTATCGACCGCATCACTGCTTGGCG	50

34.7	TGTTCCGTGGGCGGAAGTACTTGTTCATGCATCGCAACGAAACGGTTTTC	100
35.7	TGTTCCGTGGGCGGAAGTACTTGTTCATGCATCGCAACGAAACGGTTTTC	100
34.16	TGTTCCGTGGGCGGAAGTACTTGTTCATGCATCGCAACGAAACGGTTTTC	100
34.8	TGTTCCGTGGGCGGAAGTACTTGTTCATGCATCGCAACGAAACGGTTTTC	100
35.3	TGTTCCGTGGGCGGAAGTACTTGTTCATGCATCGCAACGAAACGGTTTTC	100
<i>P.pabuli</i> M1	TGTTCCGTGGGCGGAAGTACTTGTTCATGCATCGCAACGAAACGGTTTTC	100

34.7	GTTATCGCAACGGCTTTGCTAATTTGGAAGAGCAAACGCCCATCGGCGAA	150
35.7	GTTATCGCAACGGCTTTGCTAATTTGGAAGAGCAAACGCCCATCGGCGAA	150
34.16	GTTATCGCAACGGCTTTGCTAATTTGGAAGAGCAAACGCCCATCGGCGAA	150
34.8	GTTATCGCAACGGCTTTGCTAATTTGGAAGAGCAAACGCCCATCGGCGAA	150
35.3	GTTATCGCAACGGCTTTGCTAATTTGGAAGAGCAAACGCCCATCGGCGAA	150
<i>P.pabuli</i> M1	GTTATCGCAACGGCTTTGCTAATTTGGAAGAGCAAACGCCCATCGGCGAA	150

34.7	GGCGCGATCATCAACTTGTACTCCATGACCAAAATCATGACCTGCGTCGC	200
35.7	GGCGCGATCATCAACTTGTACTCCATGACCAAAATCATGACCTGCGTCGC	200
34.16	GGCGCGATCATCAACTTGTACTCCATGACCAAAATCATGACCTGCGTCGC	200
34.8	GGCGCGATCATCAACTTGTACTCCATGACCAAAATCATGACCTGCGTCGC	200
35.3	GGCGCGATCATCAACTTGTACTCCATGACCAAAATCATGACCTGCGTCGC	200
<i>P.pabuli</i> M1	GGCGCGATCATCAACTTGTACTCCATGACCAAAATCATGACCTGCGTCGC	200

34.7	AGCGCTTCAGCTTGTGGAGAGAGGACAAATGCTGCTTGGCGACCCGATCT	250
35.7	AGCGCTTCAGCTTGTGGAGAGAGGACAAATGCTGCTTGGCGACCCGATCT	250
34.16	AGCGCTTCAGCTTGTGGAGAGAGGACAAATGCTGCTTGGCGACCCGATCT	250
34.8	AGCGCTTCAGCTTGTGGAGAGAGGACAAATGCTGCTTGGCGACCCGATCT	250
35.3	AGCGCTTCAGCTTGTGGAGAGAGGACAAATGCTGCTTGGCGACCCGATCT	250
<i>P.pabuli</i> M1	AGCGCTTCAGCTTGTGGAGAGAGGACAAATGCTGCTTGGCGACCCGATCT	250

34.7	CGAACTATCTGCCGGAATATGCCGAGATGACGGTCAGAAAAACTTTGCCG	300
35.7	CGAACTATCTGCCGGAATATGCCGAGATGACGGTCAGAAAAACTTTGCCG	300
34.16	CGAACTATCTGCCGGAATATGCCGAGATGACGGTCAGAAAAACTTTGCCG	300
34.8	CGAACTATCTGCCGGAATATGCCGAGATGACGGTCAGAAAAACTTTGCCG	300
35.3	CGAACTATCTGCCGGAATATGCCGAGATGACGGTCAGAAAAACTTTGCCG	300
<i>P.pabuli</i> M1	CGAACTATCTGCCGGAATATGCCGAGATGACGGTCAGAAAAACTTTGCCG	300

34.7	AACGGGGAAGTGCGGCTGGAGAAAGCGACAAAAGCCATTACGGTGCGCGA	350
35.7	AACGGGGAAGTGCGGCTGGAGAAAGCGACAAAAGCCATTACGGTGCGCGA	350
34.16	AACGGGGAAGTGCGGCTGGAGAAAGCGACAAAAGCCATTACGGTGCGCGA	350
34.8	AACGGGGAAGTGCGGCTGGAGAAAGCGACAAAAGCCATTACGGTGCGCGA	350
35.3	AACGGGGAAGTGCGGCTGGAGAAAGCGACAAAAGCCATTACGGTGCGCGA	350
<i>P.pabuli</i> M1	AACGGGGAAGTGCGGCTGGAGAAAGCGACAAAAGCCATTACGGTGCGCGA	350

34.7	CCTGTTTACGATGACGGCCGGATTTCCTATGACGTTGGAGCACCATCTA	400
35.7	CCTGTTTACGATGACGGCCGGATTTCCTATGACGTTGGAGCACCATCTA	400
34.16	CCTGTTTACGATGACGGCCGGATTTCCTATGACGTTGGAGCACCATCTA	400
34.8	CCTGTTTACGATGACGGCCGGATTTCCTATGACGTTGGAGCACCATCTA	400
35.3	CCTGTTTACGATGACGGCCGGATTTCCTATGACGTTGGAGCACCATCTA	400
<i>P.pabuli</i> M1	CCTGTTTACGATGACGGCCGGATTTCCTATGACGTTGGAGCACCATCTA	400

Abb. A9.

Alignment von Nukleinsäuresequenzen.

Die miteinander verglichenen Sequenzen stammten aus dem Esterase-Gen des Wildtyps von *Paenibacillus pabuli* M1 und von fünf mutagenisierten Stämmen aus Tab. 8.

34.7	TCCAGGAGGCCGTGAAGAGCACGAACGGCACGTTGTCGACGCGTGAATTT	450
35.7	TCCAGGAGGCCGTGAAGAGCACGAACGGCACGTTGTCGACGCGTGAATTT	450
34.16	TCCAGGAGGCCGTGAAGAGCACGAACGGCACGTTGTCGACGCGTGAATTT	450
34.8	TCCAGGAGGCCGTGAAGAGCACGAACGGCACGTTGTCGACGCGTGAATTT	450
35.3	TCCAGGAGGCCGTGAAGAGCACGAACGGCACGTTGTCGACGCGTGAATTT	450
<i>P.pabuli</i> M1	TCCAGGAGGCCGTGAAGAGCACGAACGGCACGTTGTCGACGCGTGAATTT	450

34.7	GCGAAGGCGCTTGCGAAAGAGCCGCTGCTGTTTCGAGCCCGGGACGCAGTG	500
35.7	GCGAAGGCGCTTGCGAAAGAGCCGCTGCTGTTTCGAGCCCGGGACGCAGTG	500
34.16	GCGAAGGCGCTTGCGAAAGAGCCGCTGCTGTTTCGAGCCCGGGACGCAGTG	500
34.8	GCGAAGGCGCTTGCGAAAGAGCCGCTGCTGTTTCGAGCCCGGGACGCAGTG	500
35.3	GCGAAGGCGCTTGCGAAAGAGCCGCTGCTGTTTCGAGCCCGGGACGCAGTG	500
<i>P.pabuli</i> M1	GCGAAGGCGCTTGCGAAAGAGCCGCTGCTGTTTCGAGCCCGGGACGCAGTG	500

34.7	GAATTACAGCATGTGCCACGATGTGCTTGGCGCTTTGATTGAAGTCGTGG	550
35.7	GAATTACAGCATGTGCCACGATGTGCTTGGCGCTTTGATTGAAGTCGTGG	550
34.16	GAATTACAGCATGTGCCACGATGTGCTTGGCGCTTTGATTGAAGTCGTGG	550
34.8	GAATTACAGCATGTGCCACGATGTGCTTGGCGCTTTGATTGAAGTCGTGG	550
35.3	GAATTACAGCATGTGCCACGATGTGCTTGGCGCTTTGATTGAAGTCGTGG	550
<i>P.pabuli</i> M1	GAATTACAGCATGTGCCACGATGTGCTTGGCGCTTTGATTGAAGTCGTGG	550

34.7	ATGGCAGACGGTTCCGGCACATACTTAAAAGAGGAAATCACCGACCCGCTC	600
35.7	ATGGCAGACGGTTCCGGCACATACTTAAAAGAGGAAATCACCGACCCGCTC	600
34.16	ATGGCAGACGGTTCCGGCACATACTTAAAAGAGGAAATCACCGACCCGCTC	600
34.8	ATGGCAGACGGTTCCGGCACATACTTAAAAGAGGAAATCACCGACCCGCTC	600
35.3	ATGGCAGACGGTTCCGGCACATACTTAAAAGAGGAAATCACCGACCCGCTC	600
<i>P.pabuli</i> M1	ATGGCAGACGGTTCCGGCACATACTTAAAAGAGGAAATCACCGACCCGCTC	600

34.7	GGCATGCACGATACGGCATTGACCTGAATGACGAGCAGCAGGCCAGATT	650
35.7	GGCATGCACGATACGGCATTGACCTGAATGACGAGCAGCAGGCCAGATT	650
34.16	GGCATGCACGATACGGCATTGACCTGAATGACGAGCAGCAGGCCAGATT	650
34.8	GGCATGCACGATACGGCATTGACCTGAATGACGAGCAGCAGGCCAGATT	650
35.3	GGCATGCACGATACGGCATTGACCTGAATGACGAGCAGCAGGCCAGATT	650
<i>P.pabuli</i> M1	GGCATGCACGATACGGCATTGACCTGAATGACGAGCAGCAGGCCAGATT	650

34.7	GATCCCGCAGTATGCGTACAATGACGAGCTTGGCAAAGCCGTTTCGCATGG	700
35.7	GATCCCGCAGTATGCGTACAATGACGAGCTTGGCAAAGCCGTTTCGCATGG	700
34.16	GATCCCGCAGTATGCGTACAATGACGAGCTTGGCAAAGCCGTTTCGCATGG	700
34.8	GATCCCGCAGTATGCGTACAATGACGAGCTTGGCAAAGCCGTTTCGCATGG	700
35.3	GATCCCGCAGTATGCGTACAATGACGAGCTTGGCAAAGCCGTTTCGCATGG	700
<i>P.pabuli</i> M1	GATCCCGCAGTATGCGTACAATGACGAGCTTGGCAAAGCCGTTTCGCATGG	700

34.7	ACGGCAACGGTTTCCGGGTAGGCACGGCGCTGGAAAGCGGAGGCGCAGGA	750
35.7	ACGGCAACGGTTTCCGGGTAGGCACGGCGCTGGAAAGCGGAGGCGCAGGA	750
34.16	ACGGCAACGGTTTCCGGGTAGGCACGGCGCTGGAAAGCGGAGGCGCAGGA	750
34.8	ACGGCAACGGTTTCCGGGTAGGCACGGCGCTGGAAAGCGGAGGCGCAGGA	750
35.3	ACGGCAACGGTTTCCGGGTAGGCACGGCGCTGGAAAGCGGAGGCGCAGGA	750
<i>P.pabuli</i> M1	ACGGCAACGGTTTCCGGGTAGGCACGGCGCTGGAAAGCGGAGGCGCAGGA	750

34.7	TTGTTGTCTACCGTCAGCGATTACGCGCTGTTCCCTGAATGCATTGACTGG	800
35.7	TTGTTGTCTACCGTCAGCGATTACGCGCTGTTCCCTGAATGCATTGACTGG	800
34.16	TTGTTGTCTACCGTCAGCGATTACGCGCTGTTCCCTGAATGCATTGACTGG	800
34.8	TTGTTGTCTACCGTCAGCGATTACGCGCTGTTCCCTGAATGCATTGACTGG	800
35.3	TTGTTGTCTACCGTCAGCGATTACGCGCTGTTCCCTGAATGCATTGACTGG	800
<i>P.pabuli</i> M1	TTGTTGTCTACCGTCAGCGATTACGCGCTGTTCCCTGAATGCATTGACTGG	800

34.7	GCGCGGCACAAGCCCGGACGGCGTGCGCATCTTGTACAGGCTTCGGTCG	850
35.7	GCGCGGCACAAGCCCGGACGGCGTGCGCATCTTGTACAGGCTTCGGTCG	850
34.16	GCGCGGCACAAGCCCGGACGGCGTGCGCATCTTGTACAGGCTTCGGTCG	850
34.8	GCGCGGCACAAGCCCGGACGGCGTGCGCATCTTGTACAGGCTTCGGTCG	850
35.3	GCGCGGCACAAGCCCGGACGGCGTGCGCATCTTGTACAGGCTTCGGTCG	850
<i>P.pabuli</i> M1	GCGCGGCACAAGCCCGGACGGCGTGCGCATCTTGTACAGGCTTCGGTCG	850

Abb. A9. Fortsetzung.

```

34.7      AACTGATGCGTACGGACCATCTGAATGATTTGACCCGAGGCGACTACTCC 900
35.7      AACTGATGCGTACGGACCATCTGAATGATTTGACCCGAGGCGACTACTCC 900
34.16     AACTGATGCGTACGGACCATCTGAATGATTTGACCCGAGGCGACTACTCC 900
34.8      AACTGATGCGTACGGACCATCTGAATGATTTGACCCGAGGCGACTACTCC 900
35.3      AACTGATGCGTACGGACCATCTGAATGATTTGACCCGAGGCGACTACTCC 900
P.pabuliM1 AACTGATGCGTACGGACCATCTGAATGATTTGACCCGAGGCGACTACTCC 900
          *****

34.7      TGGGATCAAATGAAAGGCTACGGCTACGGGTTAGGCGTACGGACCCATGT 950
35.7      TGGGATCAAATGAAAGGCTACGGCTACGGGTTAGGCGTACGGACCCATGT 950
34.16     TGGGATCAAATGAAAGGCTACGGCTACGGGTTAGGCGTACGGACCCATGT 950
34.8      TGGGATCAAATGAAAGGCTACGGCTACGGGTTAGGCGTACGGACCCATGT 950
35.3      TGGGATCAAATGAAAGGCTACGGCTACGGGTTAGGCGTACGGACCCATGT 950
P.pabuliM1 TGGGATCAAATGAAAGGCTACGGCTACGGGTTAGGCGTACGGACCCATGT 950
          *****

34.7      CTCCAAGGCCGGCAGCGGCTCCTTGAGTCCGCTGGGCGAGTTCGGCTGGA 1000
35.7      CTCCAAGGCCGGCAGCGGCTCCTTGAGTCCGCTGGGCGAGTTCGGCTGGA 1000
34.16     CTCCAAGGCCGGCAGCGGCTCCTTGAGTCCGCTGGGCGAGTTCGGCTGGA 1000
34.8      CTCCAAGGCCGGCAGCGGCTCCTTGAGTCCGCTGGGCGAGTTCGGCTGGA 1000
35.3      CTCCAAGGCCGGCAGCGGCTCCTTGAGTCCGCTGGGCGAGTTCGGCTGGA 1000
P.pabuliM1 CTCCAAGGCCGGCAGCGGCTCCTTGAGTCCGCTGGGCGAGTTCGGCTGGA 1000
          *****

34.7      GCGGCGCTGCCGGCTGCATGGCCATCATCGATCCGGATTTCGGAACCTACG 1050
35.7      GCGGCGCTGCCGGCTGCATGGCCATCATCGATCCGGATTTCGGAACCTACG 1050
34.16     GCGGCGCTGCCGGCTGCATGGCCATCATCGATCCGGATTTCGGAACCTACG 1050
34.8      GCGGCGCTGCCGGCTGCATGGCCATCATCGATCCGGATTTCGGAACCTACG 1050
35.3      GCGGCGCTGCCGGCTGCATGGCCATCATCGATCCGGATTTCGGAACCTACG 1050
P.pabuliM1 GCGGCGCTGCCGGCTGCATGGCCATCATCGATCCGGATTTCGGAACCTACG 1050
          *****

34.7      GTTATGTATGCGCAGCACCTGTTGAACAGTCAGGAGCCGTACATCCAGCC 1100
35.7      GTTATGTATGCGCAGCACCTGTTGAACAGTCAGGAGCCGTACATCCAGCC 1100
34.16     GTTATGTATGCGCAGCACCTGTTGAACAGTCAGGAGCCGTACATCCAGCC 1100
34.8      GTTATGTATGCGCAGCACCTGTTGAACAGTCAGGAGCCGTACATCCAGCC 1100
35.3      GTTATGTATGCGCAGCACCTGTTGAACAGTCAGGAGCCGTACATCCAGCC 1100
P.pabuliM1 GTTATGTATGCGCAGCACCTGTTGAACAGTCAGGAGCCGTACATCCAGCC 1100
          *****

34.7      TCGCTTGAGAAATATCGTTAACGCCTGCTTATAG 1134
35.7      TCGCTTGAGAAATATCGTTAACGCCTGCTTATAG 1134
34.16     TCGCTTGAGAAATATCGTTAACGCCTGCTTATAG 1134
34.8      TCGCTTGAGAAATATCGTTAACGCCTGCTTATAG 1134
35.3      TCGCTTGAGAAATATCGTTAACGCCTGCTTATAG 1134
P.pabuliM1 TCGCTTGAGAAATATCGTTAACGCCTGCTTATAG 1134
          *****

```

Abb. A9. Fortsetzung.

7.7 Alignment von Nucleinsäuresequenzen aus den Esterase-Genen von *Paenibacillus pabuli* M1 und acht Esterase-positiven Klonen aus der angefertigten Genbibliothek

```

Klon50.40      ATGGATTTTAAACCGCTTGCTTCATTTATCGACCGCATCACTGCTTGGCGTGTTCGGT 59
Klon50.19      ATGGATTTTAAACCGCTTGCTTCATTTATCGACCGCATCACTGCTTGGCGTGTTCGGT 59
Klon50.32      ATGGATTTTAAACCGCTTGCTTCATTTATCGACCGCATCACTGCTTGGCGTGTTCGGT 59
Klon50.10      ATGGATTTTAAACCGCTTGCTTCATTTATCGACCGCATCACTGCTTGGCGTGTTCGGT 59
Klon29         ATGGATTTTAAACCGCTTGCTTCATTTATCGACCGCATCACTGCTTGGCGTGTTCGGT 59
Klon27         ATGGATTTTAAACCGCTTGCTTCATTTATCGACCGCATCACTGCTTGGCGTGTTCGGT 59
Klon20         ATGGATTTTAAACCGCTTGCTTCATTTATCGACCGCATCACTGCTTGGCGTGTTCGGT 59
PP_M1          ATGGATTTTAAACCGCTTGCTTCATTTATCGACCGCATCACTGCTTGGCGTGTTCGGT 59
Klon11         ATGGATTTTAAACCGCTTGCTTCATTTATCGACCGCATCACTGCTTGGCGTGTTCGGT 59
*****

Klon50.40      GGCGGAAGTACTTGTTCATGTCATCGCAACGAAACGGTTTTCCGTTATCGCAACGGCTTTGC 119
Klon50.19      GGCGGAAGTACTTGTTCATGTCATCGCAACGAAACGGTTTTCCGTTATCGCAACGGCTTTGC 119
Klon50.32      GGCGGAAGTACTTGTTCATGTCATCGCAACGAAACGGTTTTCCGTTATCGCAACGGCTTTGC 119
Klon50.10      GGCGGAAGTACTTGTTCATGTCATCGCAACGAAACGGTTTTCCGTTATCGCAACGGCTTTGC 119
Klon29         GGCGGAAGTACTTGTTCATGTCATCGCAACGAAACGGTTTTCCGTTATCGCAACGGCTTTGC 119
Klon27         GGCGGAAGTACTTGTTCATGTCATCGCAACGAAACGGTTTTCCGTTATCGCAACGGCTTTGC 119
Klon20         GGCGGAAGTACTTGTTCATGTCATCGCAACGAAACGGTTTTCCGTTATCGCAACGGCTTTGC 119
PP_M1          GGCGGAAGTACTTGTTCATGTCATCGCAACGAAACGGTTTTCCGTTATCGCAACGGCTTTGC 119
Klon11         GGCGGAAGTACTTGTTCATGTCATCGCAACGAAACGGTTTTCCGTTATCGCAACGGCTTTGC 119
*****

Klon50.40      TAATTTGGAAGAGCAAACGCCCATCGGCGAAGGCGCGATCATCAACTTGACTCCATGAC 179
Klon50.19      TAATTTGGAAGAGCAAACGCCCATCGGCGAAGGCGCGATCATCAACTTGACTCCATGAC 179
Klon50.32      TAATTTGGAAGAGCAAACGCCCATCGGCGAAGGCGCGATCATCAACTTGACTCCATGAC 179
Klon50.10      TAATTTGGAAGAGCAAACGCCCATCGGCGAAGGCGCGATCATCAACTTGACTCCATGAC 179
Klon29         TAATTTGGAAGAGCAAACGCCCATCGGCGAAGGCGCGATCATCAACTTGACTCCATGAC 179
Klon27         TAATTTGGAAGAGCAAACGCCCATCGGCGAAGGCGCGATCATCAACTTGACTCCATGAC 179
Klon20         TAATTTGGAAGAGCAAACGCCCATCGGCGAAGGCGCGATCATCAACTTGACTCCATGAC 179
PP_M1          TAATTTGGAAGAGCAAACGCCCATCGGCGAAGGCGCGATCATCAACTTGACTCCATGAC 179
Klon11         TAATTTGGAAGAGCAAACGCCCATCGGCGAAGGCGCGATCATCAACTTGACTCCATGAC 179
*****

Klon50.40      CAAAATCATGACCTGCGTCGCAGCGCTTCAGCTTGTGGAGAGAGGACAAATGCTGCTTGG 239
Klon50.19      CAAAATCATGACCTGCGTCGCAGCGCTTCAGCTTGTGGAGAGAGGACAAATGCTGCTTGG 239
Klon50.32      CAAAATCATGACCTGCGTCGCAGCGCTTCAGCTTGTGGAGAGAGGACAAATGCTGCTTGG 239
Klon50.10      CAAAATCATGACCTGCGTCGCAGCGCTTCAGCTTGTGGAGAGAGGACAAATGCTGCTTGG 239
Klon29         CAAAATCATGACCTGCGTCGCAGCGCTTCAGCTTGTGGAGAGAGGACAAATGCTGCTTGG 239
Klon27         CAAAATCATGACCTGCGTCGCAGCGCTTCAGCTTGTGGAGAGAGGACAAATGCTGCTTGG 239
Klon20         CAAAATCATGACCTGCGTCGCAGCGCTTCAGCTTGTGGAGAGAGGACAAATGCTGCTTGG 239
PP_M1          CAAAATCATGACCTGCGTCGCAGCGCTTCAGCTTGTGGAGAGAGGACAAATGCTGCTTGG 239
Klon11         CAAAATCATGACCTGCGTCGCAGCGCTTCAGCTTGTGGAGAGAGGACAAATGCTGCTTGG 239
*****

Klon50.40      CGACCCGATCTCGAACTATCTGCCGGAATATGCCGAGATGACGGTCAGAAAAAAGCTTTGCC 299
Klon50.19      CGACCCGATCTCGAACTATCTGCCGGAATATGCCGAGATGACGGTCAGAAAAAAGCTTTGCC 299
Klon50.32      CGACCCGATCTCGAACTATCTGCCGGAATATGCCGAGATGACGGTCAGAAAAAAGCTTTGCC 299
Klon50.10      CGACCCGATCTCGAACTATCTGCCGGAATATGCCGAGATGACGGTCAGAAAAAAGCTTTGCC 299
Klon29         CGACCCGATCTCGAACTATCTGCCGGAATATGCCGAGATGACGGTCAGAAAAAAGCTTTGCC 299
Klon27         CGACCCGATCTCGAACTATCTGCCGGAATATGCCGAGATGACGGTCAGAAAAAAGCTTTGCC 299
Klon20         CGACCCGATCTCGAACTATCTGCCGGAATATGCCGAGATGACGGTCAGAAAAAAGCTTTGCC 299
PP_M1          CGACCCGATCTCGAACTATCTGCCGGAATATGCCGAGATGACGGTCAGAAAAAAGCTTTGCC 299
Klon11         CGACCCGATCTCGAACTATCTGCCGGAATATGCCGAGATGACGGTCAGAAAAAAGCTTTGCC 299
*****

Klon50.40      GAACGGGGAAGTGCGGCTGGAGAAAGCGACAAAAGCCATTACGGTGCGCGACCTGTTTAC 359
Klon50.19      GAACGGGGAAGTGCGGCTGGAGAAAGCGACAAAAGCCATTACGGTGCGCGACCTGTTTAC 359
Klon50.32      GAACGGGGAAGTGCGGCTGGAGAAAGCGACAAAAGCCATTACGGTGCGCGACCTGTTTAC 359
Klon50.10      GAACGGGGAAGTGCGGCTGGAGAAAGCGACAAAAGCCATTACGGTGCGCGACCTGTTTAC 359
Klon29         GAACGGGGAAGTGCGGCTGGAGAAAGCGACAAAAGCCATTACGGTGCGCGACCTGTTTAC 359
Klon27         GAACGGGGAAGTGCGGCTGGAGAAAGCGACAAAAGCCATTACGGTGCGCGACCTGTTTAC 359
Klon20         GAACGGGGAAGTGCGGCTGGAGAAAGCGACAAAAGCCATTACGGTGCGCGACCTGTTTAC 359
PP_M1          GAACGGGGAAGTGCGGCTGGAGAAAGCGACAAAAGCCATTACGGTGCGCGACCTGTTTAC 359
Klon11         GAACGGGGAAGTGCGGCTGGAGAAAGCGACAAAAGCCATTACGGTGCGCGACCTGTTTAC 359
*****

```

Abb. A10.

Alignment von Nukleinsäure-Sequenzen.

Die Nukleinsäure-Sequenz der ersten 359 Basen des Esterase-Gens aus *Paenibacillus pabuli* M1 wurde mit den Sequenzen der acht Esterase-positiven Klone (Abb. 38) der angefertigten Genbibliothek verglichen.

```
Klon50.40      GATGACGGCCGGATTTTCCTATGACGTTGGAGCACCATCTATCCAGGAGGCCGTGAAGAG 419
Klon50.19      GATGACGGCCGGATTTTCCTATGACGTTGGAGCACCATCTATCCAGGAGGCCGTGAAGAG 419
Klon50.32      GATGACGGCCGGATTTTCCTATGACGTTGGAGCACCATCTATCCAGGAGGCCGTGAAGAG 419
Klon50.10      GATGACGGCCGGATTTTCCTATGACGTTGGAGCACCATCTATCCAGGAGGCCGTGAAGAG 419
Klon29         GATGACGGCCGGATTTTCCTATGACGTTGGAGCACCATCTATCCAGGAGGCCGTGAAGAG 419
Klon27         GATGACGGCCGGATTTTCCTATGACGTTGGAGCACCATCTATCCAGGAGGCCGTGAAGAG 419
Klon20         GATGACGGCCGGATTTTCCTATGACGTTGGAGCACCATCTATCCAGGAGGCCGTGAAGAG 419
PP_M1         GATGACGGCCGGATTTTCCTATGACGTTGGAGCACCATCTATCCAGGAGGCCGTGAAGAG 419
Klon11        GATGACGGCCGGATTTTCCTATGACGTTGGAGCACCATCTATCCAGGAGGCCGTGAAGAG 419
*****

Klon50.40      CACGAACGGCACGTTGTCGACGCGTGAATTTGCGAAGGCGCTTGCGAAAGA 470
Klon50.19      CACGAACGGCACGTTGTCGACGCGTGAATTTGCGAAGGCGCTTGCGAAAGA 470
Klon50.32      CACGAACGGCACGTTGTCGACGCGTGAATTTGCGAAGGCGCTTGCGAAAGA 470
Klon50.10      CACGAACGGCACGTTGTCGACGCGTGAATTTGCGAAGGCGCTTGCGAAAGA 470
Klon29         CACGAACGGCACGTTGTCGACGCGTGAATTTGCGAAGGCGCTTGCGAAAGA 470
Klon27         CACGAACGGCACGTTGTCGACGCGTGAATTTGCGAAGGCGCTTGCGAAAGA 470
Klon20         CACGAACGGCACGTTGTCGACGCGTGAATTTGCGAAGGCGCTTGCGAAAGA 470
PP_M1         CACGAACGGCACGTTGTCGACGCGTGAATTTGCGAAGGCGCTTGCGAAAGA 470
Klon11        CACGAACGGCACGTTGTCGACGCGTGAATTTGCGAAGGCGCTTGCGAAAGA 470
*****
```

Abb. A10. Fortsetzung.